

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jakub Staníček

**Určení trojrozměrné struktury helikální domény proteinu Ddi2 (DNA
damage-inducible protein 2)**

Structure determination of helical domain of DNA damage-inducible protein 2

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Klára Grantz Šašková, Ph.D.

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky Mgr. Kláry Grantz Šaškové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze

.....

Jakub Staníček

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své školitelce Kláře Grantz Šaškové za všechnu pomoc, kterou mi s vypracováním práce poskytla, a za čas, který tomu věnovala. Jsem velmi vděčný za všechny dovednosti, které mi bylo umožněno si v průběhu práce osvojit.

Dále chci poděkovat Janu Konvalinkovi, že mi umožnil práci vypracovat v tak příjemném a podnětném prostředí, jakým je jeho laboratoř.

Můj dík patří i všem ostatním členům laboratoře, zejména Michalu Svobodovi, Monice Sivé, Ivě Flaisigové a Milanu Kožíškovi, za to, že mi pomohli kdykoli jsem je o něco požádal nebo si nevěděl s něčím rady.

Velké poděkování patří Václavu Veverkovi a Rozálii Hexnerové, že mě částečně zasvětili do řešení proteinových NMR spekter, a dále za všechnu jejich práci při měření spekter a řešení studované struktury.

Obsah

Poděkování	2
Obsah	3
Seznam zkratek	6
Abstrakt	8
Abstract	9
1 Úvod	10
1.1. Ubikvitin-proteasomový systém	10
1.1.1. Úvod do problematiky ubikvitin-proteasomového systému	10
1.1.2. Ubikvitin	11
1.1.3. Systém navázání ubikvitinu na substrát: E1, E2 a E3 enzymy	13
1.1.4. Deubikvitinační enzymy	14
1.1.5. Proteasom	14
1.2. Adaptorové proteiny UPS systému	16
1.2.1. Typické znaky UBL/UBA proteinů	16
1.2.2. Rad23	16
1.2.3. Dsk2	18
1.3. Protein Ddi1	19
1.3.1. Ddi1 a jeho homology: rodina proteinů s retrovirovou proteasovou doménou	19
1.3.2. Ddi1 v <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.3.3. Lidské Ddi proteiny – Ddi1 a Ddi2	23
1.3.4. Ddi2	23
1.3.5. HDD doména lidského Ddi2	24
2 Cíle práce	26
3 Materiál a metody	27
3.1. Použitý materiál a přístroje	27
3.1.1. Seznam chemikálií	27
3.1.2. Přístrojové vybavení	28

3.1.3.	Ostatní materiály	28
3.1.4.	Bakteriální kultury, vektory.....	29
3.2.	Návrh konstruktu HDD domény lidského Ddi2 pro rekombinantní expresi.....	29
3.3.	Klonování HDD domény lidského Ddi2 do vektoru pSUMO	29
3.3.1.	Amplifikace úseku kódujícího HDD doménu	29
3.3.2.	Agarosová elektroforesa PCR produktů.....	30
3.3.3.	Izolace PCR produktu z gelu.....	31
3.3.4.	Štěpení pomocí restrikčních endonukleas a defosforylace vektoru.....	31
3.3.5.	Ligace sekvence HDD domény do pSUMO vektoru	32
3.3.6.	Transformace bakterií.....	32
3.3.7.	Minipreparace plasmidů	32
3.4.	Exprese HDD domény lidského proteinu Ddi2 v <i>E. coli</i>	33
3.5.	Purifikace HDD domény	34
3.5.1.	Niklová chelatační chromatografie.....	34
3.5.2.	Dialýza.....	35
3.5.3.	Gelová filtrace	35
3.5.4.	Odštěpení fúzního proteinu pomocí SUMO proteasy	35
3.6.	Příprava ^{15}N a ^{13}C značené HDD domény pro NMR spektroskopii	36
3.7.	Polyakrylamidová vertikální SDS elektroforesa	36
3.8.	Stanovování koncentrace proteinu	37
3.9.	Analýza struktury HDD domény v roztoku prostřednictvím NMR spektroskopie	38
3.9.1.	Měření spekter.....	38
3.9.2.	Přiřazení resonancí hlavního řetězce	38
3.9.3.	Přiřazení resonancí postranních řetězců	39
3.9.4.	Porovnání struktury HDD domény s homologními doménami.....	39
4	Výsledky	40
4.1.	Zaklonování HDD domény lidského Ddi2 do vektoru pSUMO	40
4.1.1.	Amplifikace úseku kódující HDD doménu	40
4.1.2.	Ligace sekvence HDD domény do pSUMO vektoru	40

4.2.	Expresa HDD domény v <i>E. coli</i> a její purifikace	41
4.2.1.	Růstová křivka exprese.....	41
4.2.2.	Analýza exprese a purifikace.....	42
4.2.3.	Gelová filtrace a štěpení SUMO proteasou	42
4.2.4.	Analýza purifikace HDD po odštěpení fúzního proteinu	44
4.3.	Strukturní analýza pomocí NMR spektroskopie.....	45
4.3.1.	Přiřazení resonancí hlavního řetězce	45
4.3.2.	Struktura	45
4.3.3.	Strukturní srovnání HDD domény s homologními doménami.....	48
5	Diskuze	51
6	Závěr	55
7	Literatura.....	56

Seznam zkratek

19S RP	regulační podjednotka proteasomu (z <i>angl.</i> 19S Regulatory Particle)
20S CP	katalytická podjednotka proteasomu (z <i>angl.</i> 20S Core Particle)
BSA	hovězí sérový albumin (z <i>angl.</i> Bovine Serum Albumin)
CBB G-250	Coommassie brilliant blue G-250
Ddi1	protein ze <i>S. cerevisiae</i> (z <i>angl.</i> DNA Damage-Inducible protein 1)
Ddi2	lidský homolog 2 proteinu Ddi1 ze <i>S. cerevisiae</i>
dNTPs	deoxynukleotidy
Dsk2	protein ze <i>S. cerevisiae</i> (z <i>angl.</i> Dual-Specific protein Kinase 2)
DUBs	deubikvitinasy
E1	ubikvitin aktivující enzym
E2	ubikvitin konjugující enzym
E3	ubikvitin-ligasa
EDTA	kyselina ethylendiammintetraoctová
HDD	helikální doména homologů Ddi1 (z <i>angl.</i> Helical Domain of Ddi1)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
MWCO	spodní hranice propustnosti membrány, vztaženo na velikost molekul (z <i>angl.</i> Molecular Weight Cut-Off)
NER2	komplex pro excisní opravy DNA (z <i>angl.</i> Nucleotide Excision Repair 2)
NMR	nukleární magnetická resonance
NOE	nukleární Overhauserův efekt
OD ₅₉₅	optická denzita při 595 nm
PCR	polymerasová řetězová reakce (z <i>angl.</i> Polymerase Chain Reaction)
Primer F	primer nasedající na komplementární vlákno při polymerasové řetězové reakci
Primer R	primer nasedající na kódující vlákno při polymerasové řetězové reakci
Rad23	protein ze <i>S. cerevisiae</i> (z <i>angl.</i> Radiation sensitive protein 23)

RMSD	odchylka kvadratického průměru meziatomových vzdáleností (z <i>angl.</i> Root Mean Square Deviation)
RVP	proteinová doména homologní s apartátovými proteasami retrovirů
SDS	dodecylsulfát sodný
Sti1-podobná	rodina proteinových domén homologních s fosfoproteinem Sti1 ze <i>cerevisiae</i>
SUMO	ubikvitinu příbuzný signální protein (z <i>angl.</i> Small Ubiquitin-like Modifier)
TEMED	tetramethylethylenediamin
UBA	ubikvitin vázající proteinová doména (z <i>angl.</i> Ubiquitin Associated domain)
UBL	ubikvitinu podobné proteinová doména (z <i>angl.</i> Ubiquitin-Like domain)
UBL/UBA proteiny	proteiny obsahující jak UBL, tak UBA doménu
UDPs	rodina proteinů obsahujících UBL doménu (z <i>angl.</i> Ubiquitin-like Domain Proteins)
UPS	ubikvitin-proteasomový systém
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky

Zkratky NMR spekter:

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC	z <i>angl.</i> $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Heteronuclear Single-Quantum Correlation
HNCO	název spektra odpovídá skupinám generujícím signál
HNCACO	název spektra odpovídá skupinám generujícím signál
HNCACB	název spektra odpovídá skupinám generujícím signál
CBCA(CO)NH	název spektra odpovídá skupinám generujícím signál
HCCH TOCSY	z <i>angl.</i> HCCH related Total Correlation Spectroscopy
^{15}N NOESY	z <i>angl.</i> ^{15}N related Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
^{13}C NOESY	z <i>angl.</i> ^{13}C related Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
^{15}N TOCSY	z <i>angl.</i> ^{15}N related Total Correlation Spectroscopy
2-D TOCSY	z <i>angl.</i> two dimensional Total Correlation Spectroscopy
2-D NOESY	z <i>angl.</i> two dimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

Abstract

Human Ddi2 and his homologues are scarcely explored family of ubiquitin-like/ubiquitin-associated domain proteins (UBL/UBA proteins), containing domain which is structurally related to dimeric aspartyl proteases from retroviruses. The most studied of this family is Ddi1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, which functions within the ubiquitin-proteasome system. This key cellular system exploits tightly regulated enzymatic apparatus for highly selective posttranslational modifications of proteins with molecules of ubiquitin, which serves as intracellular signal determining the proteins fate, importantly its degradation in many cases. Ddi1 plays a role of proteasome adaptor within this context, helping the recognition of ubiquitylated proteins by the proteasome.

Even though the function as a proteasome receptor is possible for human Ddi2 protein as well, its cellular role might have been altered during the evolution. One of the important steps in decoding its purpose in cell is exploration of function of its individual domains.

This work focuses on structural study of neighbouring region of this protease domain, where the helix-rich region called HDD domain is located. This region of Ddi2 was cloned, expressed and subjected to the NMR measurements. Structural information based on the NMR data was then used for structure alignments with other broadly similar known structures.

Key words: ubiquitin-proteasome pathway, retroviral aspartyl proteases, regulation of cellular processes, NMR spectroscopy

(In Czech)

Abstrakt

Lidský Ddi2 protein a jeho homology jsou málo prozkoumanou skupinou UBL/UBA proteinů obsahujících navíc doménu, jejíž struktura je příbuzná s dimerními aspartátovými proteasami retrovirů. Nejprozkoumanějším homologem je Ddi1 ze *Saccharomyces cerevisiae*, protein fungující v rámci ubikvitin-proteasomového systému. Tento klíčový buněčný systém využívá přísně regulovaný enzymatický aparát k vysoce selektivním posttranslačním modifikacím proteinů pomocí ubikvitinu. Ten následně funguje jako nitrobuněčný signál, rozhodující o dalších osudech označeného proteinu, přičemž nejčastějším důsledkem ubikvitinace bývá proteasomální degradace. Ddi1 v tomto kontextu zřejmě hraje roli adaptoru, napomáhajícího vazbě ubikvitinovaného substrátu na proteasom.

Ač je funkce adaptoru v ubikvitin-proteasomovém systému možná i v případě lidského Ddi2, vzhledem k evolučním proměnám může být jeho úloha značně pozměněna. Jedním z důležitých bodů pro pochopení nitrobuněčné role Ddi2 je odhalení funkce jeho jednotlivých domén.

Tato práce se zabývá strukturní analýsou části proteinu Ddi2 přímo sousedící s proteasovou doménou, kde se nachází helikální oblast nazvaná HDD doména. Tato část byla naklonována, exprimována a změřena pomocí NMR spektroskopie. Strukturní data založená na údajích z NMR byla dále využita ke strukturním srovnáním se známými strukturami obdobných proteinových domén.

Klíčová slova: ubikvitin-proteasomový systém, retrovirové aspartátové proteasy, regulace buněčných procesů, NMR spektroskopie

1 Úvod

1.1. Ubikvitin-proteasomový systém

1.1.1. Úvod do problematiky ubikvitin-proteasomového systému

Proteolýza je pro fungování buňky podstatný nástroj zajišťující celou řadu funkcí, od poskytování zásoby aminokyselin pro proteosyntesu, přes odbourávání poškozených či špatně sbalených proteinů až po účast v signálních a regulačních systémech buňky. K tomuto účelu buňka disponuje různými systémy.

Extracelulární proteiny jsou buňkou degradovány prostřednictvím lysosomů, malých membránových organel specializovaných k degradaci makromolekul [1]. Proteiny jsou buňkou přijaty endocytosou a prostřednictvím vesikulů dopraveny do nitra buňky, kde váčky následně splývají s lysosomy a jejich obsah je degradován lysosomálními hydrolasami. Tímto způsobem mohou být degradovány i intracelulární molekuly, v některých případech celé organely, k čemuž dochází v procesu zvaném autofagie, kdy je část cytoplasmy obalena membránou a fúzována s lysosomem. Štěpení proteinů v lysosomech je exergonické, nespecifické a probíhá pro všechny proteiny přibližně stejně rychle.

Při výzkumu degradace cytoplasmatických proteinů vyšlo najevo, že proteolýza většiny proteinů musí probíhat i jiným, řízeným způsobem, a sice přímo v cytoplasmě a za účasti ATP [2]. Značné rozdíly v poločasech života různých proteinů a fakt, že proteasy zodpovědné za štěpení se vyskytují ve stejném kompartmentu jako jejich substráty, poukazovaly na existenci přísně regulovaného systému, který by za účasti ATP selektivně zajišťoval štěpení pouze správných proteinů ve správný čas.

Tímto systémem je dnes již dobře známý ubikvitin-proteasomový systém (UPS) [3]. Ubikvitin je malý protein, který v tomto systému funguje jako signální molekula. Pokud je navázán na protein správným způsobem, nasměruje jej k degradaci v proteasomu - velkém proteinovém komplexu válcovitého tvaru - v jehož dutině dojde k rozštěpení proteinu na krátké peptidy. Označení proteinů, které je potřeba degradovat, mají na starost specializované ligasy. Ty ve spolupráci s dalšími enzymy naváží na protein polyubikvitinový řetězec [4]. Antagonisty těchto ligas je skupina tzv. deubikvitinas (zkr. DUBs), které naopak konjugované ubikvitiny z proteinů odštěpují, což ve výsledku vytváří dynamickou rovnováhu mezi ubikvitinací a deubikvitinací.

Řízená degradace proteinů v proteasomu byl první popsaný buněčný systém využívající k signalizaci ubikvitin. Nadále zůstává nejvýznamnějším a nejlépe

prozkoumaným, není však zdaleka jediný. Ukázalo se, že funkce ubikvitinu je mnohem universálnější a ubikvitinace je v buňce široce rozšířená posttranslační modifikace, jejíž funkce se v závislosti na kontextu značně liší. Polyubikvitinové řetězce byly popsány jako klíčové signály pro asociaci proteinových komplexů zajišťujících opravy poškozené DNA [5]. Ubikvitinace membránových proteinů u *S. cerevisiae* aktivuje jejich endocytosu [6]]. Procesy regulované ubikvitinací zahrnují takové děje jako apoptosa, endocytosa, autofagie či progrese buněčného cyklu [7]. Z epigenetického hlediska je významná ubikvitinace histonů H2A a H2B [8]. Proteinů, jejichž aktivita, lokalizace a vzájemné interakce jsou ubikvitinací modulovány, existuje celá řada [9]. Z tohoto hlediska můžeme ubikvitinaci přirovnat k jiné široce rozšířené posttranslační modifikaci, fosforylaci, a stejně jako u fosforylace jsou možnosti regulace buněčných dějů prostřednictvím ubikvitinace velmi rozmanité [10].

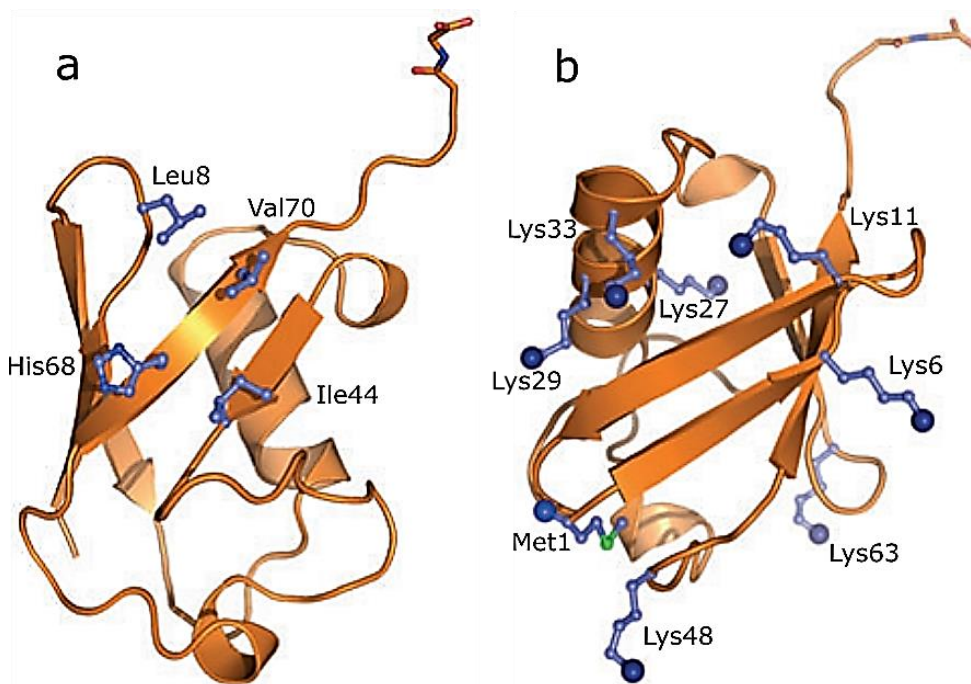
1.1.2. Ubikvitin

Ubikvitin je malý protein o délce 76 aminokyselin. Poprvé byl popsán jako výrazně konservovaný protein vyskytující se ve všech eukaryotních organismech, čemuž také vděčí za svůj název (z *angl.* ubiquitous, všudypřítomný) [11]. U člověka i u kvasinek byly objeveny čtyři geny pro ubikvitin – *UB52*, *RPS27A*, *UBB*, *UBC* [12–14]. Dva kódují ubikvitin ve formě fúzního proteinu s ribosomálními proteiny: gen *RPS27A* produkuje fúzní protein ubikvitinu s ribosomálním proteinem S27a z podjednotky 40S, produkt genu *UB52* s ribosomálním proteinem L40 z podjednotky 60S [14]. *UBB* a *UBC* produkují polymerní ubikvitinové prekursory o třech, respektive devíti podjednotkách, které jsou následně rozštěpeny na jednotlivé ubikvitiny pomocí specifických DUBs [13]. Sekvence ubikvitinu a jeho struktura jsou zobrazeny na Obrázku 1 (str. 12).

Ubikvitin je buňkou využíván k posttranslačním modifikacím jiných proteinů, na které se váže isopeptidovou vazbou prostřednictvím karboxylové skupiny na svém C-konci [15]. Místem navázání v cílovém proteinu jsou aminoskupiny lysinových postranních řetězců. Samotný ubikvitin rovněž obsahuje sedm lysinů, což umožňuje jeho řetězení za vzniku polyubikvitinových řetězců. Možnost řetězení prostřednictvím odlišných lysinů, včetně možnosti větvení, znamená velkou teoretickou rozmanitost výsledných ubikvitinových řetězců, a s tím spojenou rozdílnou signální funkci. Pro interakce ubikvitinu je důležitá hydrofobní oblast zahrnující aminokyseliny Ile44, Leu8, Val70 a His68 [16]. Různé řetězení polyubikvitinů má za následek rovněž různé rozmístění hydrofobních

interakčních míst na povrchu řetězce, což vytváří specifické vazebné povrchy rozpoznávané příslušnými receptory [9].

Homogenní řetězce obsahují stále stejný typ vazby mezi ubikvitiny, neboli všechny ubikvitiny mají ten následující připojený přes stejný lysin. Řetězce tohoto typu jsou v buňce zastoupeny nejhojněji, a jejich funkce je také nejlépe známa. Dobře prozkoumané jsou zejména řetězce propojené přes Lys48 a přes Lys63. Kovalentní modifikace proteinu polyubikvitinem spojovaným přes Lys48 je signálem pro degradaci tohoto proteinu v proteasomu [17], přičemž nejkratší řetězec schopný spustit degradaci je tetraubikvitin [18].



Obrázek 1. Struktura ubikvitinu ze dvou různých pohledů. Pro ubikvitin a jemu podobné struktury je charakteristické právě uspořádání β -listu a α -helixu patrné z obrázku. Obrázek vlevo (a) obsahuje modře zvýrazněné hydrofobní aminokyseliny Ile44, Leu8, Val70 a His68, tvořící hlavní interakční povrch. V obrázku vpravo (b) jsou modrou barvou zvýrazněné všechny aminokyselinové zbytky, které se v kontextu buňky mohou účastnit kovalentních vazeb na jiné proteiny: Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63, N-terminální Met1 a C-terminální Gly76. Převzato z [9].

Polyubikvitinové řetězce propojené přes Lys63 slouží často jako signál při sestavování oligomerních enzymových komplexů, například v reakci na poškození DNA a následné opravě [18], nebo při zánětlivé odpovědi indukované cytokiny [19].

Ostatní homogenní řetězce jsou prozkoumány málo. Zdá se, že řetězce propojené Lys11 zřejmě pro specifické substráty doplňují Lys48 řetězce v proteasomální degradaci, a Lys27 řetězce by mohly hrát úlohu v odbourávání poškozených mitochondrií [20].

1.1.3. Systém navázání ubikvitinu na substrát: E1, E2 a E3 enzymy

Za navázání ubikvitinu na cílový protein a tvorbu specifických polyubikvitinových řetězců zodpovídá třístupňový enzymový systém, zahrnující ubikvitin aktivující enzym (E1), ubikvitin konjugující enzym (E2) a následně ligasu (E3), zodpovědnou za tvorbu vazby mezi C-koncovým glycinem ubikvitinu a cílovým substrátem [4]. Obdobný systém je původcem všech známých ubikvitinací, bez ohledu na jejich funkci.

E1 enzymů se v buňkách obecně vyskytuje málo verzí, například *Saccharomyces cerevisiae* má jen jediný [21]. E1 enzymy začínají celý proces ubikvitinace aktivací ubikvitinu. Nejprve za spotřeby ATP dochází ke vzniku adenylátu ubikvitinu, kdy se z ATP odštěpuje PP_i a AMP se fosfoesterovou vazbou váže na C-terminální karboxyl ubikvitinu. V další fázi je pak ubikvitin navázán na cysteinovou thiolovou skupinu E1 enzymu za vzniku thioesterové vazby a odštěpení AMP [22].

Dalším krokem je přenesení ubikvitinu z enzymu E1 na jeden z enzymů E2. Těch je obecně větší množství než E1, například *Saccharomyces cerevisiae* disponuje jedenácti E2 oproti jednomu E1, u vyšších organismů jsou to pak řádově desítky E2 enzymů. Všechny E2 obsahují zachovanou doménu o přibližně sto padesáti aminokyselinách, zahrnující aktivní místo s katalytickou thiolovou skupinou na cysteinu [23]. Sem se přenáší a thioesterovou vazbou váže ubikvitin z E1.

Nejpočetnější skupinou enzymů účastnících se ubikvitinačního procesu jsou E3 ligasy, čítající řádově stovky odlišných variant. Jejich funkcí je přenos ubikvitinu z E2 na substrát a jejich vysoký počet je dán požadavky na vysoce specifické rozpoznání substrátu. Mechanismus přenosu ubikvitinu z E2 na substrát může být různý – záleží na konkrétním E3 enzymu. Existují dvě hlavní rodiny E3 enzymů z nichž každá uskutečňuje ubikvitinaci substrátu odlišně. První je rodina proteinů obsahujících RING domény (z *angl.* Really Interesting New Gene) [24]. RING doména se váže na E2 enzym a vzniklý komplex E2-E3 uskutečňuje přenos ubikvitinu na substrát přímo z thioesterové vazby E2 [25]. Druhou skupinou jsou proteiny s HECT doménou (z *angl.* Homologous to E6AP Carboxy Terminal), které na sebe nejprve thioesterovou vazbou navazují ubikvitin dodaný E2 enzymem a pak ho přenáší přímo na cílový protein [26].

Zvláštní skupinou jsou takzvané U-box proteiny, někdy řazené do E3 enzymů, někdy označované jako E4 enzymy. Jedná se o modifikované RING proteiny, které nemají vlastní substrát, místo toho se pouze podílí na tvorbě polyubikvitinových řetězců na proteinech ubikvitinovaných jinými E3 ligasami [27].

1.1.4. Deubikvitinační enzymy

Označení proteinu ubikvitinem nemusí být definitivní. Buňka disponuje rovněž nástroji pro odštěpení ubikvitinu, což je označováno jako deubikvitinace [28]. Lidský genom obsahuje geny pro zatím známých 79 deubikvitinačních enzymů (zkr. DUBs), neboli deubikvitinas [29]. Jedná se o skupinu specializovaných isopeptidas, jejichž funkcí je štěpit vazbu mezi C-koncovým glycinem ubikvitinu a proteinem na nějž se váže, přičemž tímto proteinem může být i další ubikvitin [30, 31]. Svou aktivitou fungují jako antagonisté k činnosti E3 ligas.

DUBs se podle vzájemné příbuznosti dělí do pěti hlavních rodin: UCHs (z angl. Ubiquitin C-terminal Hydrolases), USPs (z angl. Ubiquitin-Specific Proteases), OTUs (z angl. Ovarian Tumor Proteases), Josephiny a JAMMs (z angl. JAB1/MPN/MOV3 metalloenzymes). Enzymy z JAMMs rodiny mají metaloproteasovou aktivitu, enzymy s ostatních čtyř rodin fungují všechny jako cysteinové proteasy [32].

Kritéria, určující afinitu DUBs k substrátu, který štěpí, jsou různá: jejich funkce může být specifická buď pro konkrétní protein, konkrétní typ ubikvitinového řetězce, případně může být asociovaná s proteasomem. Deubikvitinasy asociované s proteasomem obsahují doménu, která s proteasomem interaguje, a chovají se tak jako jeho volné podjednotky. Jejich účel je odštěpovat navázané polyubikvitinové řetězce ze substrátu putujícího do proteasomu, aby nebyly v proteasomu degradovány spolu se substrátem. Tím zajišťují recyklaci molekul ubikvitinu a jejich dostatečnou zásobu pro ubikvitinační reakce probíhající v buňce. Na této funkci se s nimi podílí deubikvitinasy specifické k určitému typu řetězce, které volné řetězce v cytoplasmě dále rozštěpí až na jednotlivé molekuly ubikvitinu. Štěpí však i řetězce navázané na proteiny, jedná-li se o řetězec, k jehož štěpení je daná deubikvitinasa určena. Poslední skupina substrátově specifických DUBs štěpí řetězce různých typů, za předpokladu, že jsou navázané ke konkrétnímu proteinu či proteinům, pro jejichž deubikvitinaci je daný enzym určen. Jejich funkce je především regulační, jelikož jejich činnost zpomaluje degradaci daného proteinu či jiný buněčný děj spjatý s jeho ubikvitinací [9, 28]. O ubikvitinaci proteinu tak rozhoduje více protichůdných faktorů, což umožňuje komplexnější regulaci tohoto klíčového buněčného děje.

1.1.5. Proteasom

Finální fázi degradačního procesu proteinů obstarává 26S proteasom. Jedná se o velký proteinový komplex, složený ze dvou hlavních částí, označovaných dle jejich sedimentačních koeficientů: regulační části 19S RP (z angl. 19S Regulatory Particle)

a katalytické části 20S CP (z *angl.* 20S Core Particle). 20S CP se skládá ze čtyř kruhů, každém o sedmi podjednotkách, seskládaných do válcovité struktury, v jejímž nitru se skrývá proteolyticky aktivní místo [33]. Buď jeden, nebo oba konce válce jsou pak kryty 19S RP, rovněž tvořené z většího množství podjednotek, rozdělených na dva subkomplexy. Prvním je víko (z *angl.* Lid), kryjící vstup do proteasomu, druhým je subkomplex označovaný jako základna (z *angl.* Base), přiléhající k 20S CP. Základna je tvořena deseti podjednotkami: prvních šest nese označení Rpt 1-6, a jedná se o podjednotky s ATPasovou aktivitou, zodpovědné za rozbalení proteinu před jeho transportem do nitra 20S CP a podílející se na rozpoznávání polyubikvitinových řetězců [34, 35].

Zbylé čtyři podjednotky nesou označení Rpn (Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13), dle anglické zkratky pro regulační neATPasovou podjednotku (*angl.* Regulatory particle non-ATPase). Mnoho výzkumů funkce podjednotek bylo prováděno na kvasinkách: u Rpn2 není známa interakce se substrátem [36] a její funkce je zřejmě především strukturní, ostatní podjednotky fungují jako receptory rozpoznávající substrát.

Rpn10 a Rpn13 váží polyubikvitinové řetězce [37, 38]. Role Rpn10 je zřejmě komplexnější, neboť krom formy integrované v proteasomu se značný podíl buněčného Rpn10 vyskytuje volně v cytoplasmě. Zde plní regulační úlohu prostřednictvím interakcí s dalšími proteiny: například negativně ovlivňuje vazbu ubikvitinových řetězců a dalších faktorů na proteasom [39, 40]. Tento inhibiční vliv Rpn10 může být potlačen její monoubikvitinací.

Rpn1 obsahuje větší množství vazebných míst, a byla u ní krom vázání ubikvitinových řetězců popsána také interakce s proteiny obsahujícími UBL domény (z *angl.* Ubiquitin-like domain) [41]. U člověka byla na rozdíl od kvasinek popsána i interakce mezi UBL doménami a lidským homologem Rpn10, S5a [42].

Proteiny s UBL doménami (UDPs, z *angl.* Ubiquitin-like Domain Proteins) tvoří poměrně obsáhlou skupinu, která je charakteristická přítomností UBL domény, svou buněčnou funkcí se však mohou značně lišit. Charakteristickou vlastností všech UBL domén je především jejich terciární struktura, sestávající, stejně jako u ubikvitinu, z pěti vláknového β -listu, na nějž svrchu nasedá α -helix. Charakteristická funkční vlastnost UDPs, zprostředkovávaná UBL doménami, je schopnost interagovat s proteasomem [43]. Nejlépe prozkoumanou skupinou UDPs jsou UBL/UBA proteiny, fungující jako adaptorové proteiny v rámci UPS systému.

1.2. Adaptorové proteiny UPS systému

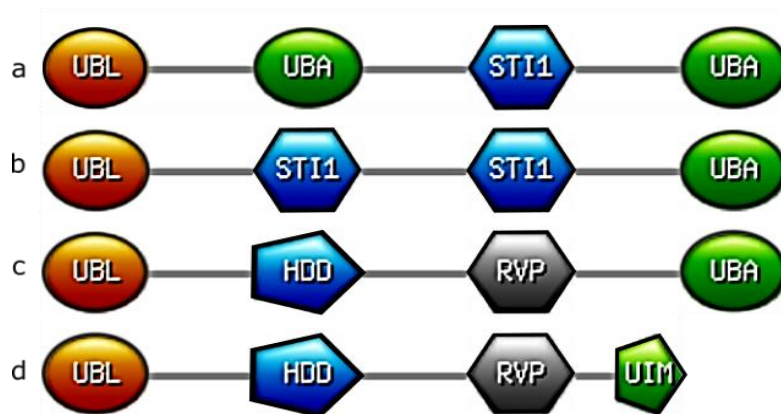
1.2.1. Typické znaky UBL/UBA proteinů

Označení UBL/UBA proteiny pro tuto skupinu proteinů vychází z jejich charakteristické struktury: na N-konci nesou UBL doménu a dále v sekvenci pak obsahují alespoň jednu UBA doménu (z *angl.* Ubiquitin Associated domain). Hlavní funkční charakteristikou UBA domén, je jejich schopnost vázat ubikvitinové řetězce [44, 45]. Krom schopnosti vázat ubikvitin mají UBA domény také schopnost vázat některé UBL domény a ve spojitosti s tím byla u UBL/UBA proteinů popsána tvorba homodimerů i heterodimerů [46]. Doménová organizace vybraných UBL/UBA proteinů je vidět na Obrázku 2 (str. 17).

Určité UBL/UBA proteiny spojuje schopnost vázat ubikvitinované substráty a zároveň vázat proteasom. Nejlépe popsané UBL/UBA proteiny jsou Rad23, Dsk2, méně pak Ddi1. Jeden z navržených modelů pro funkci těchto proteinů je funkce adaptoru pro rozpoznání substrátu proteasomem: protein naváže ubikvitinovaný substrát svou UBA, doménou, UBL doménou naváže proteasom a navede substrát do proteasomu [47]. Grafické znázornění této funkce zobrazuje Obrázek 3 (str. 18). Tento model podporovala zjištění, že se v buňkách s neaktivním genem pro některý z UBL/UBA proteinů hromadí ubikvitinované substráty [43, 48]. Zdánlivě protichůdným zjištěním je fakt, že nadměrná exprese UBL/UBA proteinů rovněž vede ke zvýšení množství ubikvitinovaných proteolytických substrátů [47, 49]. Důvodem může být kompetice o vazebná místa na proteasomu: funkce adaptorových proteinů je ovlivněná jejich koncentrací, protože při vysoké koncentraci je proteasom blokován volnými adaptory, které snižují pravděpodobnost vazby adaptoru s navázaným substrátem. V souladu s tím je i fakt, že k inhibici proteolysy stačí zvýšená koncentrace části proteinu obsahujícího UBL doménu [47].

1.2.2. Rad23

Rad23 je 398 aminokyselin dlouhý protein, silně evolučně zachovaný od kvasinek až po člověka [46]. Lidský homolog se označuje hHR23 a je biochemicky obdobný jako Rad23. V buňce se vyskytuje ve dvou variantách: hHR23a a hHR23b, které jsou přes mírné odlišnosti funkčně zaměnitelné [50–52].

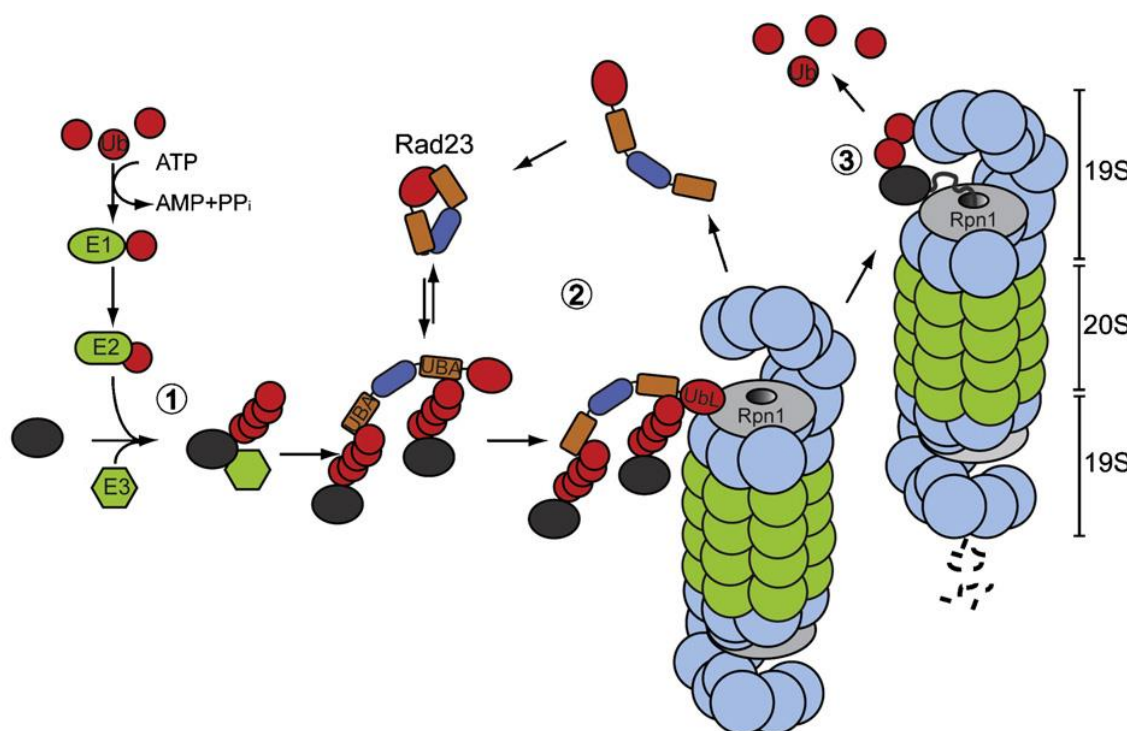


Obrázek 2. Porovnání doménových uspořádání jednotlivých UBL/UBA proteinů, velikosti a délky jsou pouze schematické. Jednotlivé proteiny: (a) Rad23, (b) Dsk2, (c) kvasinkové Ddi1, (d) lidské Ddi2.

Rad23 byl prvním popsáným proteinem s UBL doménou i prvním proteinem, u nějž byla navržena funkce proteasomového adaptoru. Poprvé byl popsán v kvasinkách jako faktor, účastnící se oprav poškozené DNA, jehož absence v buňkách s chybějícím genem RAD23 vedla k přecitlivělosti na UV záření [53]. Rad23 tvoří NER2 komplex (z *angl.* nucleotide excision repair) s Rad4 (v lidském případě proteinem XPC, homologem Rad4), proteinem opravné dráhy pro poškozenou DNA, a indukuje jeho vazbu na DNA poškozenou UV zářením [54, 55]. V souvislosti s opravami DNA se Rad23 vyskytuje především v jádře [52].

Rad23 má čtyři domény: UBL, dvě UBA domény a XPC-vázací doménu. UBL doména na N-konci Rad23 má vysokou homologii s ubikvitinem a může za něj být v sekvenci zaměněna, aniž by došlo k narušení funkce proteinu. Naopak její delece vede ke zvýšení UV sensitivity buněk, stejně jako při deleci celého proteinu, což poukazuje na její nezbytnost pro správnou funkci Rad23 v dráze pro opravy DNA [56]. Zároveň váže 26S proteasom [57]. Obě UBA domény byly identifikovány jako místa vazací Lys48 a Lys63 polyubikvitinové řetězce na ubikvitinovaných proteinech [47, 58]. Schopnost ambivalentně vázat ubikvitinované proteiny i proteasom, spolu se studiemi delece či nadměrné exprese Rad23 a s nimi spojenými defekty proteolysy [47, 48], vedly k navržení hypotézy, že Rad23 funguje jako jakási „volná podjednotka“ proteasomu, transientně se vázající na 19S RP i ubikvitinovaný substrát a podporující proteolysu substrátu [47].

XPC vazací doména je místem interakce s Rad4. Jedná se o doménu podobnou Sti1 (zkr. Sti1-podobná), což je rodina domén homologních s chaperonin-vázacím motivem fosfoproteinu Sti1 [59, 60].



Obrázek 3. Teoretická funkce proteasomového adaptoru v rámci UPS systému, demonstrovaná na příkladu Rad23. V levé části obrázku (část 1) je znázorněna ubiquitinace substrátového proteinu (černě) systémem E1, E2 a E3 enzymů (zeleně). Ve střední části obrázku (část 2) je znázorněno navázání substrátu proteinem Rad23 interakcí mezi navázaným ubiquitinem (červeně) a UBA doménami Rad23 (hnědě). Rovněž je zde ukázáno navázání Rad23 na proteasom prostřednictvím UBL domény (červeně), čímž je substrát naveden do proteasomu, a následuje oddisociování Rad23 a jeho reutilizace. V pravé části obrázku (část 3) je pak naznačena deubikvitinace rozpoznaného substrátu, jeho rozbalení účinkem 19S podjednotky, transport do nitra proteasomu a následné rozštěpení na krátké peptidy. Převzato z [61].

Tato doména je stejně jako UBL důležitá k účasti Rad23 na opravách DNA a její pozměnění vede k senzitivě buňky na UV [59]. Fakt, že k potlačení citlivosti na UV je důležitá jak vazba na Rad4, tak vazba na proteasom, poukazuje na důležitost interakce proteasomu s NER2 v opravě DNA. Bylo však prokázáno, že tato role proteasomu nesouvisí s jeho proteolytickou aktivitou, ale pouze s aktivitou ATPasových podjednotek 19S RP. Funkce proteasomu v této dráze se proto zdá být čistě regulační [62].

1.2.3. Dsk2

Jedná se o 373 aminokyselin dlouhý protein, který byl identifikován jako účastník procesu duplikace dělicího vřeténka v kvasinkách, jehož se účastní spolu s Rad23 [63, 64]. V buňkách skokana (*Xenopus laevis*) byla krom toho popsána interakce Dsk2 s cyklinem A

a inhibiční účinek vysokých koncentrací Dsk2 na buněčné dělení [65]. Podobně jako Rad23 obsahuje jak UBL doménu, tak UBA doménu, a dále doménu podobnou Sti1, která slouží k interakci s proteinem Stch, příbuzným chaperonu Hsp70 [64, 66]. Podobně jako u Rad23 byly u Dsk2 i jeho lidských homologů prokázány interakce jak s podjednotkami proteasomu, tak s ubikvitinovanými proteiny, a v buňkách s nadměrnou expresí Dsk2 dochází k hromadění ubikvitinovaných substrátů proteasomu podobně jako u Rad23 [44, 49, 67]. Na rozdíl od Rad23 byla u lidského homologu Dsk2 popsána i interakce s E3 ligasami [67]. Na základě těchto zjištění byla funkce proteasomového adaptorového proteinu navržena i pro Dsk2 [49]. Krom cytosolických proteinů je Dsk2 potřebný i pro efektivní degradaci špatně sbalených proteinů v endoplasmatickém retikulu [68]. Nadměrná exprese Dsk2 je pro buňku letální [39].

Dsk2 vykazuje zajímavou funkční spolupráci s proteasomovou podjednotkou Rpn10. Tento ubikvitinový receptor vykazuje krom afinity k ubikvitinu také afinitu k UBL doméně Dsk2 [69]. Rpn10 se v buňce vyskytuje jak vázaná v proteasomu, tak volná v cytoplasmě. Volná forma této podjednotky interaguje s Dsk2 prostřednictvím jeho UBL domény a negativně reguluje jeho přístup k proteasomu [39]. Rpn10 však může být buňkou ubikvitinována, čímž se snižuje její afinita k ubikvitinu [70] a rovněž se tím snižuje její vliv na interakci mezi Dsk2 a proteasomem [71].

1.3. Protein Ddi1

1.3.1. Ddi1 a jeho homology: rodina proteinů s retrovirovou proteasovou doménou

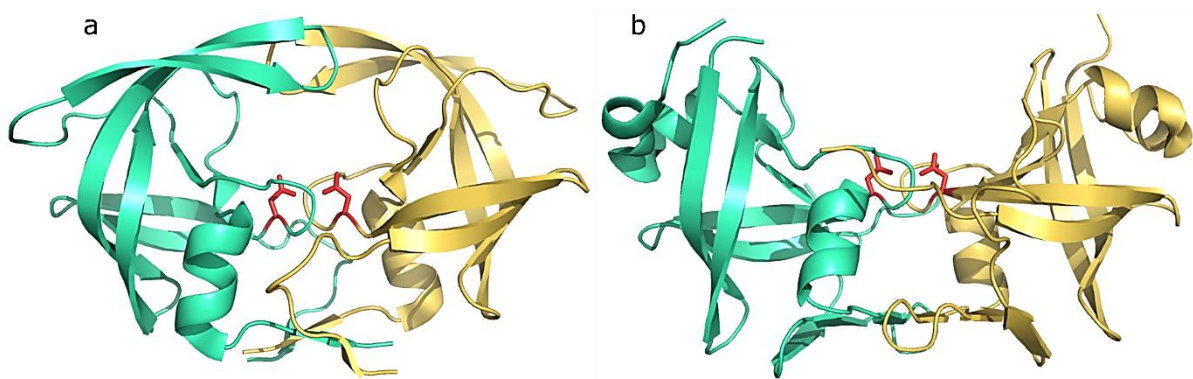
Označení Ddi1 vychází z anglické zkratky pro protein indukovaný poškozením DNA (*angl.* DNA damage inducible protein). Poprvé byl tento protein popsán v *Saccharomyces cerevisiae* [72], ale jeho homology se vyskytují napříč eukaryotními organismy ve vysoce evolučně zachované podobě, což naznačuje zásadní funkci tohoto proteinu [73].

Znaky Ddi1 a jeho homologů jsou N-koncová UBL doména, aspartátová proteasová doména (zkr. RVP, z *angl.* retroviral protease) a C-koncová UBA doména. Z tohoto typického schématu se vymykají pouze obratlovci, u jejichž homologů Ddi1 došlo v průběhu evoluce ke zkrácení na C-konci a tím ke ztrátě UBA domény [73, 74].

Typickým znakem homologů Ddi1, mezi UDPs ojedinělým, je jejich aspartátová proteasová doména. Zajímavá je především vysoká homologie s aspartátovými proteasami retrovirů, dimerními strukturami, které jsou využívány např. virem HIV ke štěpení jeho polyproteinů během dozrávání virových částic [75]. Jejich strukturní porovnání je zobrazeno

na Obrázku 4 (str. 20). Homology Ddi1 obsahují v rámci RVP domény typickou sekvenci aspartát-serin/threonin-glycin, charakteristickou pro aspartátové proteasy, a strukturní studie rovněž potvrdily jejich schopnost tvořit dimery [73, 76].

Tyto znaky jsou evolučně zachované napříč organismy včetně savců, což podporuje hypotézu, že proteolytická aktivita Ddi1 je podstatná pro jeho buněčnou funkci [73].



Obrázek 4. Srovnání (a) proteasy z viru HIV (PDB kód 4LL3) [77] a (b) RVP domény proteinu Ddi1 ze *Saccharomyces cerevisiae* (PDB kód 2I1A) [76]. U obou struktur je barevně zvýrazněna dimerní struktura odlišným zbarvením řetězců, růžově jsou obarveny katalytické aspartáty v aktivním místě. Obrázky byly vytvořeny v programu PyMOL™ (v. 1.30).

Bohužel proteolytická aktivita Ddi1 je velmi špatně zmapována: jediným organismem, u něž byla prokázána proteolytická aktivita RVP domény, je parazitický prvok *Leishmania major*, jehož RVP doména je schopná štěpení peptidů při kyselém pH, přičemž tato aktivita je senzitivní na typické inhibitory aspartátových proteas [78].

Ať už je to dáno proteolytickou aktivitou RVP nebo ne, buněčná funkce Ddi1 vyžaduje přítomnost RVP domény a je citlivá na změny v této doméně [79]. Může to znamenat, že její proteolytická aktivita je důležitá, ale projevuje se jen v kontextu specifických regulačních interakcí v buňce. Další možností je, že je pro protein klíčová schopnost RVP domény vytvářet dimery.

I když je RVP doména unikátní mezi UDPs, v savcích buňkách se vyskytují i další proteiny obsahující dimerní aspartátovou proteasovou doménu. Řadí se sem například myší neuronové jaderné receptory NIX1, NRIP2 a NRIP3 a jejich homology [73], či lidská nebo myší kožní aspartátová proteasa hSASP, respektive mSASP [80, 81]. Během vývoje obratlovců došlo zřejmě k duplikaci genu *DDI1*, což vedlo k jeho funkčnímu rozrůznění

mimo jeho původní roli [73], a tato třída proteinů by mohla hrát roli ve fyziologii savčích tkání [81].

1.3.2. Ddi1 v *Saccharomyces cerevisiae*

V *Saccharomyces cerevisiae* byl protein Ddi1 popsán poprvé, jako gen transkripčně indukovaný genotoxickým stresem [72]. Má typickou doménovou stavbu nižších eukaryot: N-koncovou UBL doménu, C-koncovou UBA doménu a RVP doménu umístěnou mezi nimi. UBL doména váže proteasom, u UBA domény byly popsány interakce s ubikvitinovanými substráty [45, 82].

UBL doména Ddi1 je ve srovnání s ostatními UBL/UBA proteiny netypická: přestože má ubikvitinové uspořádání, její sekvenční homologie s ubikvitinem je velmi malá, jen 14 %. Krom toho má neobvyklé interakční preference: pro UBL doménu zcela netypicky neinteraguje s žádnými ubikvitin-interagujícími motivy ani UBA doménami, na rozdíl od příslušných domén Dsk2 a Rad23. UBL doména Ddi1 má tedy sice obdobnou terciární strukturu, ale její interakční preference jsou zcela odlišné. Nej překvapivější vlastností této domény je její schopnost vázat ubikvitin, a to poměrně silně, přestože fyziologická role této interakce zůstává neznámá [74].

Při výzkumu buněk s mutovaným genem pro Pds1 bylo zjištěno, že nadměrná exprese Ddi1 potlačuje patologickou přecitlivělost na zvýšenou teplotu způsobenou mutací *pds1-128*, stejně tak nadměrná exprese Rad23 [83]. Pds1 je regulátor buněčného cyklu, který se podílí na regulaci oddělování sesterských chromatid, a jehož cílená degradace pomocí UPS spouští přechod z metafáze do anafáze [84]. K potlačení teplotní senzitivity *pds1-128* pomocí zvýšené exprese Ddi1 je potřebná funkční UBA doména, při její disfunkci nemá Ddi1 na teplotní senzitivitu žádný efekt. I když vliv Ddi1 na Pds1 není přesně popsán, bylo navrženo, že přítomnost Ddi1 stabilizuje přítomnost Pds1 v buňce, čímž oddaluje přechod do anafáze. Pravděpodobně Ddi1 rozpoznává ubikvitinované Pds1 a inhibuje jeho další ubikvitinaci [83], což je mechanismus známý u Rad23 [85]. Na základě těchto zjištění byl zkoumán dvojitý mutant *ddi1Δ rad23Δ*, vykazující přecitlivělost na genotoxický stres a defekty v buněčném cyklu, především vstup do anafáze před ukončením S-fáze. To indikuje roli jak Rad23, tak Ddi1 v S-fázovém kontrolním bodě. Funkce těchto dvou proteinů v kontrole buněčného cyklu se zřejmě do značné míry překrývají, protože mutant *ddi1Δ* i mutant *rad23Δ* vykazují pouze drobné defekty [83].

Vzhledem k UBL/UBA struktuře lze u Ddi1 očekávat funkci adaptorového proteinu UPS. Ddi1 je potřebný pro proteasomální degradaci dvou proteinů: Ufo1 a HO endonukleasy [82, 86].

HO endonukleasa štěpí dvojvlákno DNA během výměny pářícího typu buněk a je velmi rychle degradována ubiquitin-proteasomovou dráhou, její poločas v buňkách je jen 8 minut. Pro účely degradace musí být HO endonukleasa nejprve exportována z jádra, kde se normálně vyskytuje, do cytoplasmy. Tam je rozpoznána specifickým E3 ligasovým komplexem, zvaným SCF, ubiquitinována a degradována. Během buněčné reakce na poškození DNA je HO endonukleasa fosforylována a její degradace je tím výrazně urychlena [87–89].

Důkazy, že Ddi1 funguje pro HO endonukleasu jako ubiquitinový receptor nezbytný pro degradaci, jsou silné: HO endonukleasa interaguje s Ddi1 prostřednictvím jeho UBA domény, pro tuto interakci je nezbytná ubiquitinace HO endonukleasy, zároveň UBL doménou Ddi1 interaguje s 19S podjednotkou proteasomu a v *ddi1Δ* buňkách dochází k silné stabilizaci HO endonukleasy a ta se hromadí v cytoplasmě [82].

Ufo1 je F-box protein, který je součástí SCF komplexu, vykonávajícího ubiquitinaci HO, a je zodpovědný za navázání HO na komplex [88]. Ddi1 s Ufo1 pravděpodobně interaguje, a v *ddi1Δ* buňkách je Ufo1 silně stabilizován [86].

Další oblastí, kde byla zaznamenána role Ddi1, v tomto kontextu původně označované jako Vsm1, je vesikulární transport. Ddi1 interaguje jak s exocytickými, tak endocytickými v-SNARE proteiny (Snc1 a Snc2). Nadměrná exprese Ddi1 snižuje sekreci proteinů do média v buňkách nesoucích mutaci v genu pro t-SNARE protein Sec9, zároveň v buňkách s delecí genu pro Ddi1 dochází ke zvýšení sekrece proteinů do okolí, což poukazuje na pravděpodobnou funkci Ddi1 jako negativního regulátoru exocytosy [90].

V jiné studii bylo zjištěno, že Ddi1 váže exocytický t-SNARE protein Sso1. Tato interakce brání navázání Sso1 na jeho interakčního partnera Sec9, což způsobuje pozorované inhibiční účinky Ddi1 na exocytosu. Navázání Ddi1 na Sso1 je podpořeno fosforylací Sso1 [91]. Vazebné místo v Ddi1, zodpovědné za vazbu Sso1, se nachází mezi RVP a UBA doménou, a bylo objeviteli označeno jako Sso1-vázající doména. Ta obsahuje fosforylační místo, které rovněž slouží k regulaci exocytosy [79]. K regulaci exocytosy jsou nicméně zapotřebí i RVP a UBL doména [92]. Krom inhibice exocytosy je Ddi1 zapotřebí také pro endocytosu guanin nukleotid-vázajícího proteinu Gα [93].

1.3.3. Lidské Ddi proteiny – Ddi1 a Ddi2

O lidském homologu Ddi1 nebylo dosud nic publikováno a zůstává tak málo známým proteinem s neprozkoumanou funkcí, zde uvedené informace pochází z práce provedené v laboratoři Jana Konvalinky a Kláry Grantz Šaškové.

Z bioinformatické analýsy vyplývá, že v průběhu vývoje došlo oproti Ddi1 v *S. cerevisiae* k několika zásadním změnám. Nejprve se během vývoje obratlovců protein zkrátil na C-konci, což vedlo ke ztrátě jeho UBA domény. Další změna se týká evoluce savců, během které došlo ke zdvojení genu pro homolog Ddi1.

V lidském genomu se tak nacházejí geny pro dva homology Ddi1: *DDI1*, kódující 396 aminokyselin dlouhý Ddi1 homolog 1 (Ddi1), který se nachází na chromosomu 11, a *DDI2*, kódující 399 aminokyselin dlouhý Ddi1 homolog 2 (Ddi2), nacházející se na chromosomu 1. Tyto dvě varianty proteinu sdílejí 70% sekvenční identitu a 81% podobnost [94].

1.3.4. Ddi2

Navzdory číslování, na základě organizace obou genů u člověka lze říct, že vývojově původní verzi genu je *DDI2*, který je podobnější homologním genům v kvasinkách a nesavcích obratlovcích. Gen *DDI1* neobsahuje žádné introny, tudíž se zdá, že jeho vznik je důsledkem retrotranspozice genu *DDI2*.

Jak je uvedeno výše, Ddi2 postrádá UBA doménu. Podrobnější průzkum okolí genu *DDI2* odhalil, že k tomu s nejvyšší pravděpodobností došlo insercí nového obratlovčího genu *RSC1A1* do sekvence *DDI2* mezi oblast RVP domény a UBA domény. Tím došlo k oddělení sekvence kódující UBA doménu od zbytku proteinu a jejímu včlenění do genu *RSC1A1*.

Ztráta UBA domény je zásadní změnou oproti Ddi1 z *S. cerevisiae*, protože tím se narušuje klasické uspořádání UBL/UBA proteinu a role Ddi2 coby proteasomového adaptorového proteinu se tak stává značně diskutabilní. Zachování této buněčné funkce by vyžadovalo jinou funkční jednotku schopnou interagovat s ubikvitinem. Bioinformatický průzkum v této souvislosti odhalil po srovnání homologů Ddi1 z různých organismů kandidáta na tuto funkci, jímž je krátký C-koncový úsek, typický pro homology obratlovců. Tato sekvence, dlouhá 24 aminokyselin, vykazuje vysokou podobnost rodině proteinů s ubikvitin-interagujícím motivem (UIM). Pro ověření interakce této UIM části s ubikvitinem byla proto provedena NMR titrace: pro tyto účely byl využit fragment Ddi2 obsahující UIM a nejkratší možnou část RVP stále zajišťující dimerizaci. Výsledky ukázaly

slabou interakci s monoubikvitinem. Další studie s ubikvitinovými řetězci všech možných typů pomocí afinitní chromatografie však byly negativní na jakoukoli vazbu s UIM.

Na základě vlastností UBL domény z *S. cerevisiae* [74] mohla funkci interakce s ubikvitinem zastávat rovněž UBL doména Ddi2. Strukturní analýsa této domény pomocí NMR ukázala, že prostorové uspořádání kvasinkové i lidské UBL domény je výrazně podobné, nicméně obě varianty se velmi liší povrchovým nábojem. Zatímco kvasinková UBL doména je kladně nabitá, což jí umožňuje vázat záporně nabitý ubikvitin [74], lidská UBL doména je nabitá jen velmi málo. V souladu s těmito fakty byla při titraci lidské UBL domény ubikvitinem pomocí NMR naměřena jen extrémně slabá, pravděpodobně fyziologicky nerelevantní interakce.

Strukturní studie RVP domény Ddi2 pomocí krystalografie a SAXS (z *angl.* Small Angle X-ray Scattering) ukázaly, že má typickou dimerní strukturu RVP domén homologů Ddi1, a že nese zachovalé všechny typické znaky aspartátových proteas, včetně signální sekvence Asp-Ser-Gly-Ala v katalytickém místě. S velkou pravděpodobností by tedy skutečně mohla být funkční proteasou. Nicméně průzkum její proteolytické aktivity, využívající peptidovou knihovnu odvozenou ze savčích buněk, nedetekoval žádnou aktivitu. RVP z Ddi2 tedy buď potřebuje aktivaci prostřednictvím specifických nitrobuněčných stimulů, nebo je neaktivní [94].

1.3.5. HDD doména lidského Ddi2

Ve snaze prozkoumat lépe funkci RVP domény Ddi2 bylo její okolí podrobeno strukturní bioinformatické predikci, jelikož z obdobných studií prováděných na Ddi1 v *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že oblast proteinu přilehlá k N-konci RVP domény tvoří oblast bohatou na α -helixy, která byla nazvána HDD doménou (z *angl.* Helical Domain of Ddi1) [95].

Analýsa pomocí doménových prediktorů a prediktorů sekundární struktury ukázala, že i lidský Ddi2 zřejmě obsahuje obdobnou HDD doménu, neboť předpověděla formaci bohatou na α -helixy v sousedství N-konce RVP domény. Jednalo se o sekvenci v rozmezí aminokyselin 125 – 212. V oblasti aminokyselin 125-178 byla navíc detekována podobnost s rodinou Sti1-podobných domén [94].

Sti1-podobné domény jsou rodina domén strukturně homologních s fosfoproteinem Sti1 (z *angl.* Stress Inducible protein 1), v savcích označovaný jako Hop (z *angl.* Hsp operating protein). Jedná se o malý helikální fosfoprotein, který váže molekulární chaperony Hsp70 a Hsp90 a reguluje jejich funkci [96–98]. Sti1-podobné domény se vyskytují

v mnoha dalších proteinech, kde povětšinou zprostředkovávají interakce protein-protein. V souvislosti s Ddi2 je zajímavá především jejich přítomnost v proteinech Dsk2 a Rad23. Dsk2 prostřednictvím své Sti1-podobné domény váže chaperon Stch, pro Rad23 je jeho Sti1-podobná doména klíčová pro vázání Rad4 (viz příslušné kapitoly výše). Příbuznost HDD domény se Sti1-podobnými doménami na ni tudíž poukazuje jako na potenciální místo důležitých meziproteinových interakcí lidského proteinu Ddi2. Její těsná blízkost s RVP doménou může HDD doménu implikovat jako regulační místo ovlivňující proteasovou funkci Ddi2. Neúspěchy při odhalování proteolytických funkcí RVP domén navzdory jejich podobnosti s funkčními aspartátovými proteasami a vysoké zakonzervovanosti jejich katalytického centra naznačují, že by se mohlo jednat o proteasy aktivní, nicméně přísně regulované v rámci buněčného kontextu. Právě HDD doména se tedy nabízí jako vazebné místo pro takovou regulační interakci. Další možností je funkce HDD domény jako specifického vazebného povrchu, sloužícího pro selektivní rozpoznávání příslušného substrátu.

2 Cíle práce

- 1) Klonování predikované sekvence HDD domény lidského Ddi2 proteinu a její ligace do vektoru pSUMO pro bakteriální expresi
- 2) Transformace *E. coli* vektorem pSUMO se zaklonovanou sekvencí HDD domény a následná exprese proteinového konstruktu tvořeného HDD doménou a fúzním proteinem SUMO:
 - (a) v běžném LB médiu
 - (b) v M9 médiu pro získání $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ značeného proteinu
- 3) Izolace exprimovaného proteinového konstruktu, jeho purifikace a odštěpení fúzního proteinu
 - (a) purifikace neznačené HDD domény pro ověření postupu
 - (b) využití ověřeného protokolu k purifikaci izotopově značené HDD domény
- 4) Získání struktury HDD domény pomocí NMR spektroskopie
- 5) Strukturní porovnání vypočtené struktury HDD domény Ddi2 s proteinovými doménami, u kterých lze předpokládat určitou strukturní podobnost: s HDD doménou z Ddi1 *Saccharomyces cerevisiae*, Sti1-podobnou doménou Rad23 ze *Saccharomyces cerevisiae* a Sti1-podobnou doménou z hHR23A, lidského homologu Rad23

3 Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a přístroje

3.1.1. Seznam chemikálií

- **Bio-Rad, Hercules (USA)**
agarosa
- **Biosynth AG, Staad (Švýcarsko)**
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)
- **Biotika, Slovenská Ľupča (SR)**
ampicilin
- **Biotium, Hayward (USA)**
GelRed
- **Cambridge Isotope Laboratories, Andover (USA)**
chlorid amonný (^{15}N -značený), D-glukosa (^{13}C -značená)
- **Lach-Ner, Neratovice (ČR)**
kyselina octová, ethanol, formaldehyd, kyselina chlorovodíková, isopropanol, octan draselný, dihydrogenfosfát draselný, dihydrogenfosfát sodný, hydroxid amonný, dusičnan stříbrný
- **Merck, Billerica (USA)**
deuteriová voda
- **New England BioLabs, Ipswich (USA)**
XhoI, BamHI, Phusion® vysokoúčinná DNA polymerasa, 5x Phusion HF pufr, 10x NEB pufr 3.1, hovězí sérový albumin (BSA), směsný roztok deoxynukleotidů (dNTPs), antarktická fosfatasa, reakční pufr pro antarktickou fosfatasu
- **Penta, Prague (ČR)**
chlorid sodný, methanol, hydroxid sodný, sacharosa, heptahydrát síranu hořečnatého, thiosíran sodný, uhličitan sodný, síran sodný, kyselina boritá
- **Roche Diagnostics GmbH, Basel (Švýcarsko)**
inhibitorový koktejl Complete Mini
- **Serva, Heidelberg (Německo)**
bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue G-250
- **Sigma-Aldrich, Buchs (Švýcarsko)**

kyselina diammintetraoctová (EDTA), dodecylsulfát sodný (SDS), LB médium, LB agar, 2-merkapt ethanol, glycerol, HEPES, imidazol, sacharosa, azid sodný, N,N'-metylenbisakrylamid, chlorid vápenatý, thiamin, D-biotin, BME Vitamin 100x solution, tetrahydrát chloridu železnatého, tetrahydrát chloridu manganatého, hexahydrát chloridu kobaltnatého, chlorid zinečnatý, dihydrát chloridu měďnatého, dihydrát chloridu vápenatého, dihydrát molybdenanu sodného

- **USB, Cleveland (USA)**
akrylamid, glycin, TRIS
- **rekombinantně připraveno v laboratoři Jana Konvalinky:**
SUMO proteasa

3.1.2. Přístrojové vybavení

- termocykler GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer (USA)
- inkubátor Innova® 44/44 R, New Brunswick Scientific (Německo)
- aparatura na horizontální elektroforesu, Gibco (USA)
- fotoaparát Quantum ST4, Vilber Lourmat (Francie)
- centrifugy: Allegra® X-15R, Beckman Coulter (USA); 5415 R, Eppendorf (Germany); Sorvall Evolution RC, Thermo Scientific (USA)
- homogenisátor EmulsiFlex-C3, AVESTIN (Kanada)
- UV-VIS spektrofotometr UNICAM UV 500, Thermo Scientific (USA)
- spektrofotometr Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific (USA)
- aparatura na vertikální elektroforesu, SIGMA-ALDRICH (USA)
- ÄKTAExplorer FPLC systém, Amersham Pharmacia Biotech - GE Healthcare Bio-Sciences (USA)
- suchá míchací lázeň Thermocell Mixing Block MB102, BIOER Technology (Čína)
- inkubátor IPP 400, Memmert GmbH (Německo)

3.1.3. Ostatní materiály

- kolona Superdex™ 75pg 16/60 FPLC, Amersham Pharmacia Biotech - GE Healthcare Bio-Sciences (USA)
- dialyzační membrána Spectrapore, Spectrum Laboratories (USA)
- zahušťovací kolonky Centricon-10 (7000 MWCO), Millipore (USA)
- QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN (USA)

- Zyppy Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research (USA)
- resin Ni-NTA Superflow, QIAGEN (USA)

3.1.4. Bakteriální kultury, vektory

- bakteriální kmen *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL, Novagen (USA)
- bakteriální kmen *Escherichia coli* TOP10, Novagen (USA)
- pSUMO vektor (z laboratoře Jana Konvalinky)

3.2. Návrh konstruktu HDD domény lidského Ddi2 pro rekombinantní expresi

Požadovaná sekvence byla zaklonována do pSUMO vektoru. Jedná se o vektor nesoucí ampicilinovou resistenci a T7 promotor. Použité bakterie BL21(DE3)RIL obsahují gen pro T7 polymerasu, který je regulovaný *lacUV5* operátorem. Systém je navržen tak, aby přítomnost laktosy či IPTG v médiu indukovala expresi proteinu z vektoru.

V sekvenci vektoru před místem určeném k zaligování požadovaného genu se nachází sekvence kódující šest histidinů polyhistidinové kotvy, následovaná DNA sekvencí pro SUMO protein, který je produkován ve fúzi s vloženým proteinem. Slouží jako stabilizační a solubilizační faktor exprimovaného konstruktů. Po izolaci ze směsi lze SUMO odštěpit vysoce specifickou SUMO proteasou a pomocí polyhistidinové kotvy oddělit z roztoku.

Produkt PCR reakce byl navržen s konečnou délkou 313 bazí. Výsledný exprimovaný protein má délku 218 aminokyselin a cca 24 kDa, produkt získaný po odštěpení fúzního SUMO proteinu má délku 98 aminokyselin a cca 11 kDa. Konstrukt je zobrazen na Obrázku 5 (str. 30).

3.3. Klonování HDD domény lidského Ddi2 do vektoru pSUMO

3.3.1. Amplifikace úseku kódujícího HDD doménu

PCR reakce byla použita k izolaci sekvence kódující HDD doménu a její amplifikaci. Primery použité v reakci jsou uvedeny v Tabulce 1. Modře jsou označena vložená restrikční místa pro *Bam*HI (GGATCC) a *Xho*I (CTCGAG) restrikční endonukleasy.

Tabulka 1: Primery použité pro amplifikaci HDD domény

Primer	Sekvence
F	5' - CA GGATCC CAGCAGTCCCACTCA-3'
R	5' - TT CTCGAG CTACTATTGCCTTATATCTTCTTCCTATC-3'

10 20 30 40 50 60
 MSHHHHHHHH GMSDSEVNQE AKPEVKPEVK PETHINLKVS DGSSEIFFKI KKTTPLRRLM
 70 80 90 100 110 120
 EAFAKRQGKE MDSLRFlyDG IRIQADQTPE DLDMEDNDII EAHREQIGGS GIORPTSTSS
 130 140 150 160 170 180
 SQQSHSSPGE ITSSPQGLDN PALLRDMLLA NPHELSSLKE RNPPLAEALL SGDLEKFSRV
 190 200 210
 LVEQQQDRAR REQERIRLFS ADPFDLEAQA KIEEDIRQ

Obrázek 5. Sekvence navrženého proteinového konstruktu pro produkci proteinu z vektoru pSUMO. Modrou barvou je vyznačena polyhistidinová kotva, žlutou barvou je označena sekvence patřící proteinu SUMO. Červená šipka vyznačuje štěpné místo SUMO proteasy.

Jako templát byl použit kompletní gen pro lidskou Ddi2 z laboratoře Jana Konvalinky. Byly provedeny dvě reakce: samotná amplifikační reakce a negativní kontrola, neobsahující templátovou DNA. Složení reakčních směsí je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Složení reakčních směsí pro PCR reakci

	Amplifikační reakce	Negativní kontrola
HPLC H ₂ O	19,9 µl	20,9 µl
5x HF pufr	6µl	6µl
dNTPs	1µl	1µl
templátová DNA	1µl	-
Phusion® polymerasa	0,1µl	0,1µl
Primer F	1µl	1µl
Primer R	1µl	1µl

PCR reakce byly provedeny v termocykleru GeneAmp PCR System 2400 za následujících podmínek:

- 1) 98°C/30s
- 2) (98°C/10s - 56°C/20s - 72°C/3min) 35 cyklů
- 3) 72°C/5min

Průběh PCR byl následně ověřen pomocí agarové elektroforesy.

3.3.2. Agarosová elektroforesa PCR produktů

- 1% agarosový gel: 0,5 g agarosy, 50 ml destilované vody, 5 µl GelRed 10 000x (Biotium)
- vzorkový pufr: 40% (w/v) sacharosa, 0,1% (w/v) bromfenolová modř

- TAE pufr: 57,1 ml 99% CH₃COOH, 100 ml 0,5M EDTA, 242 g Tris-HCl, doplněno vodou na 1l, pH upraveno na 8

Gel byl nalit v aparatuře pro horizontální agarosovou elektroforesu Gibco. Reakční směs z PCR byla smíchána se vzorkovým pufrém v poměru 5:1 (výsledný objem 35 µl) a nanášena do jamek v gelu. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit Gel Pilot 50bp. Elektroforesa probíhala 30 minut při napětí 120 V. DNA byla detekována pomocí UV lampy. Obrázek gelu byl pořízen pomocí fotoaparátu Quantum ST4.

3.3.3. Izolace PCR produktu z gelu

Kýžený produkt PCR reakce byl v gelu identifikován pod UV lampou podle polohy, odpovídající očekávané délce 313 bází. Část gelu, obsahující amplifikovanou sekvenci, byla vyříznuta sterilní žiletkou, zvážena a umístěna do plastové mikrozkuřavky. Izolace DNA z gelu byla provedena pomocí sady QIAquick Gel Extraction Kit dle příslušného protokolu od výrobce [99]. Ke gelu v mikrozkuřavce (cca 250 mg) byl přidán QG pufr o přibližně trojnásobku hmotnosti gelu (750 µl) a 3 minuty inkubován v 56°C pro rozpuštění gelu. Následně bylo do směsi přidáno 250 µl isopropanolu a směs byla přenesena do mikrozkuřavky s kolonkou určenou k separaci DNA z roztoku. Směs v mikrozkuřavce byla zcentrifugována (13 000 g, 1 min, 25°C, centrifuga 5415 R) a filtrát byl odstraněn. Na kolonku bylo přidáno 700 µl PE pufru, zcentrifugováno (13 000 g, 1 min, 25°C, centrifuga 5415 R) a filtrát byl opět odstraněn. Nakonec byla kolonka přenesena do čisté mikrozkuřavky, bylo přidáno 40 µl HPLC vody a necháno 5 minut inkubovat. Následně byl roztok DNA zcentrifugován do mikrozkuřavky (13 000 g, 1 min, 25°C, centrifuga 5415 R).

3.3.4. Štěpení pomocí restrikčních endonukleas a defosforylace vektoru

Produkt PCR a pSUMO vektor bylo následně nutné naštěpit restrikčními endonukleasami *Bam*HI a *Xho*I. Složení reakčních směsí je uvedeno v Tabulce 3. Reakce byly inkubovány po dobu tří hodin ve 37°C.

Tabulka 3		
	Složení reakčních směsí pro štěpení restrikčními endonukleasami	
	reakční směs 1	reakční směs 2
10x NEB pufr	5 µl	5 µl
<i>Bam</i> HI	1 µl	1 µl
<i>Xho</i> I	1 µl	1 µl
BSA	0,5 µl	0,5 µl
štěpená DNA	40 µl roztoku DNA pro HDD doménu (c ~ 98 ng/µl)	40 µl roztoku pSUMO vektoru (c ~ 112 ng/µl)
H ₂ O	2,5 µl	2,5 µl

V dalším kroku bylo nutné defosforylovat vektor, proto byly do směsi s vektorem přidány složky pro defosforylační reakci, které jsou shrnuty v Tabulce 4. Reakce byla inkubována 15 min ve 37°C v inkubátoru IPP 400, následně byla na 5 minut umístěna do 70°C pro teplotní deaktivaci fosfatasy.

Tabulka 4 Složky defosforylační reakce

pufr pro Antarktickou fosfatasu	6 µl
roztok s naštěpeným vektorem	50 µl
Antarktická fosfatasa	3 µl
H ₂ O	1 µl

Vektor i sekvence HDD domény byly posléze ze směsi odděleny agarosovou elektroforesou a následně izolovány z gelu (viz kapitoly 3.3.2. a 3.3.3.).

3.3.5. Ligace sekvence HDD domény do pSUMO vektoru

Oba získané DNA produkty byly využity v následující ligační reakci. Krom ligační reakce byla provedena i negativní kontrola, do níž byl vložen jen vektor bez PCR amplifikátu HDD domény. Složení reakčních směsí je shrnuto v Tabulce 5. Reakce byla ponechána při laboratorní teplotě přes noc.

Tabulka 5 Složení ligační směsi

	Ligační směs	Negativní kontrola
HPLC H ₂ O	13 µl	15 µl
pufr pro T4 ligasu	2 µl	2 µl
roztok pSUMO vektoru	2 µl	2 µl
roztok DNA sekvence HDD domény	2 µl	-
T4 ligasa	1 µl	1 µl

3.3.6. Transformace bakterií

10 µl ligační směsi bylo přidáno k 40 µl kompetentních *E. coli* buněk TOP10, které byly následně transformovány dle Sambrooka [100]. Stejně bylo postupováno pro negativní kontrolu. Buňky byly ponechány 30 minut na ledu, následně na 90 sekund vloženy do 42 °C, načež byly opět zchlazeny na ledu. K buňkám byl přidán 1 ml LB média a byly inkubovány 1 hodinu ve 37 °C. Směs byla následně rovnoměrně rozetřena na Petriho misku s LB agarem obsahujícím ampicilin a inkubována během noci ve 37 °C v inkubátoru IPP 400.

3.3.7. Minipreparace plasmidů

- růstové médium: 12 ml LB Média, 12 µl 1000x ampicilin (Biotika, SR)

12 ml růstového média bylo zaočkováno bakteriálními koloniemi získanými transformací. Kultura byla ponechána přes noc v inkubátoru Innova® 44/44 R o teplotě 30 °C, s třepáním nastaveným na 220 RPM. Poté byla kultura centrifugována (5250 g, 10 min, 25 °C, centrifuga Allegra® X-15R), médium dekantováno, peletka byla resuspendována v 600 µl vody a následně přenesena do plastové mikrozkušavky. Dále byla k izolaci plasmidů z buněk použita sada Zyppy Plasmid Miniprep Kit dle přiloženého protokolu od výrobce [101]. Bylo přidáno 100 µl 7x lyzačního pufru, roztok změnil barvu na modrou. Roztok dvě minuty stál pro kompletní lysi buněk, načež bylo přidáno 350 µl vychlazeného neutralizačního pufru. Roztok změnil barvu na žlutou a došlo k vytvoření precipitátu. Roztok byl pečlivě promíchán, aby byla neutralizace kompletní. Roztok byl centrifugován (13 000 g, 15 min, 25 °C, centrifuga 5415 R) až došlo k usazení precipitátu, načež byl supernatant přenesen do Zymo-Spin INN kolonky, umístěné v plastové mikrozkušavce. Po centrifugaci (15 s, centrifuga 5415 R) byl na kolonu přidán Endo-Wash pufr, znovu byl zcentrifugován (15 s, centrifuga 5415 R) a nakonec byl přidán Zyppy Wash pufr a zcentrifugován (15 s, centrifuga 5415 R). Kolona byla přemístěna do čisté mikrozkušavky a na kolonu byl přidán Zyppy Elution pufr o objemu 30 µl. Kolona byla ponechána jednu minutu inkubovat pro uvolnění DNA z kolony, načež byla zcentrifugována (30 s, centrifuga 5415 R). Výsledkem byl roztok obsahující vyizolované plasmidy o objemu 30 µl. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

3.4. Exprese HDD domény lidského proteinu Ddi2 v *E. coli*

- Pufr A: 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl,
- Růstové médium: 6x 0,5 l LB média s 500 µl 10 000x ampicilinu

K expresi byla využita plasmidová DNA připravená minipreparací v kapitole 3.3.7. Bakteriální kultura *E. coli* BL21(DE3)RIL o objemu 200 µl byla transformována 12 µl roztoku plasmidů dle Sambrooka [100] teplotním šokem obdobně jako v kapitole 3.3.6. Ke kultuře byl přidán 1 ml LB média a následně byla kultura inkubována 1 h v teplotě 37 °C. Bakterie byly následně rozděleny na agarové plotny obsahující ampicilin po 400 µl na plotnu a ponechány přes noc rozrůst.

Kolonie, které se vytvořily na plotnách, byly suspendovány v LB médiu obsahujícím ampicilin (100mg/l) o objemu 12 ml. Tato suspenze byla použita k zaočkování šesti připravených lahví s růstovým médiem, do každé z lahví bylo přidáno 1,5 ml suspenze.

Zaočkované láhve byly umístěny do třepacího inkubátoru Innova® 44/44 R s teplotou 37 °C a frekvencí třepání 220 RPM.

Růst buněk byl následně sledován spektrofotometricky prostřednictvím optické density média při 595 nm (OD₅₉₅) na spektrofotometru UNICAM UV 500. V okamžiku, kdy OD₅₉₅ dosáhlo hodnoty přibližně 0,7, bylo ke kultuře přidáno IPTG do výsledné koncentrace 0,75 mM, čímž došlo k indukci produkce rekombinantního proteinu. Ke sklizení buněk došlo přibližně za tři a čtvrt hodiny, kdy OD₅₉₅ dosáhlo hodnoty cca 2,5. Médium s buňkami bylo centrifugováno (6000 g, 10 min, 20 °C, centrifuga Allegra® X-15R), peleta byla zvážena a resuspendována v pufru A v poměru přibližně 10 ml pufru A ku 1 g pelety. Do suspenze byla přidána tableta proteasových inhibitorů Complete Mini a rozpuštěna. Viskosní suspenze byla homogenizována v Potter-Elvehjemově homogenisátoru a následně třikrát homogenizována ve 4 °C v přístroji EmulsiFlex-C3 při tlaku 1200 bar. Takto vzniklý buněčný lysát byl centrifugován (20 000 g, 15 min, 4 °C, centrifuga Sorvall Evolution RC), supernatant odebrán a zamražen pro pozdější použití. Bylo takto získáno cca 80 ml supernatantu.

Z kultury byl těsně před indukcí a před homogenizací odebrán vzorek 0,5 ml pro pozdější analýsu pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.7.).

3.5. Purifikace HDD domény

3.5.1. Niklová chelatační chromatografie

- Promývací pufr: 50 mM Tris, 50 mM imidazol, pH 8.0
- Eluční pufr: 50 mM Tris, 250 mM imidazol, pH 8.0

Po rozmražení supernatantu z předchozího kroku bylo během celého postupu purifikace se vzorky pracováno na ledu nebo v chladové místnosti se 4 °C. Supernatant byl rozdělen na dvě části po 40 ml a do každé byl přidán 1 ml suspenze resinu Ni-NTA Superflow v promývacím pufru. Supernatant s resinem byl následně umístěn na rotační míchadlo do 4 °C a ponechán přes noc inkubovat.

Po inkubaci byly obě části centrifugovány (3000 g, 5 min, 4 °C, centrifuga Allegra® X-15R) pro oddělení resinu od roztoku. Supernatant byl dekantován a uchován v lednici pro případnou opětovnou purifikaci. Resin z obou částí byl slit dohromady a byl třikrát promyt následujícím způsobem: bylo přidáno 10 ml promývacího pufru, 5 minut inkubováno na rotační míchačce, následně zcentrifugováno (3000 g, 5 min, 4 °C, centrifuga Allegra® X-15R), supernatant byl odstraněn. Po třech promytích bylo k resinu přidáno 5 ml elučního

pufru a inkubováno 2 h na rotační míchačce ve 4 °C. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována (3000 g, 5 min, 4 °C, centrifuga Allegra® X-15R) a byl odpipetován supernatant obsahující požadovaný proteinový konstrukt HDD domény fúzované se SUMO.

3.5.2. Dialysa

- dialyzační pufr: 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol

Pro účely zbavení se imidazolu použitého k eluci byla provedena dialysa, pomocí které byl proteinový konstrukt převeden do pufru vhodného pro další čistící kroky.

Roztok proteinu po eluci z resinu o objemu 5 ml byl napipetován do dialyzačního střívka Spectrapore o 6-8 kDa MWCO. K dialyse byly využity 3 l dialyzačního pufru, rozděleného na dvě části po 1,5 l. Pečlivě uzavřené střívko bylo umístěno do první části pufru, na magnetickou míchačku ve 4 °C, kde bylo 2 h dialyzováno. Po dvou hodinách bylo přemístěno do druhé, nepoužité části pufru a dialyzováno po další 3 h.

3.5.3. Gelová filtrace

- mobilní fáze: 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol
- kolona: Superdex™75pg 16/60 FPLC (GE Healthcare Bio-Sciences)

Roztok proteinu byl zahuštěn na centrifugační dialyzační koloně 7000 MWCO na koncentraci 5-20 mg/mg a přefiltrován přes filtr 0,22 µl. Zároveň byla kolona ekvilibrována puftrem, použitým jako mobilní fáze. Poté byl vzorek nanesen na kolonu a dělen při průtoku 1 ml/min. Průběh chromatografie byl sledován prostřednictvím spektrofotometrie při vlnové délce 280 nm. Frakce odpovídající maximu absorpance byly dále analyzovány pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.7.), načež byly spojeny do jedné falkony.

3.5.4. Odštěpení fúzního proteinu pomocí SUMO proteasy

Dalším nutným krokem bylo odštěpení fúzního proteinu SUMO z konstruktů za pomoci SUMO proteasy. K roztoku konstruktů o objemu 5 ml ($c \sim 2$ mg/ml) bylo napipetováno 200 µl SUMO proteasy ($c \sim 0,5$ g/l). Směs byla následně inkubována 2 h při laboratorní teplotě.

Po ukončení dialysy a štěpení bylo nutné oddělit SUMO proteasu a odštěpené SUMO od HDD domény. SUMO proteasa na sobě podobně jako SUMO nesla polyhistidinovou kotvu. Do roztoku byl přidán 1 ml suspenze Ni-NTA Superflow resinu a směs byla inkubována přes noc ve 4 °C. Následně byla směs centrifugována (3000 g, 5 min, 4 °C,

centrifuga Allegra® X-15R), supernatant s HDD doménou byl odpipetován do čisté falkony a uskladněn v lednici, byl odebrán vzorek pro SDS elektroforesu.

3.6. Příprava ^{15}N a ^{13}C značené HDD domény pro NMR spektroskopii

- M9 médium: 6,8 g Na_2HPO_4 ; 3 g K_2HPO_4 ; 0,112 g Na_2SO_4 ; 0,500 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,120 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,080 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,034 mg ZnCl_2 ; 0,030 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,002 mg H_3BO_4 ; 0,061 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,500 mg EDTA; složky přidané až po autoklávování: 0,81 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$; 4 g ^{13}C D-glukosy; 2,46 g MgSO_4 ; 0,44 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 mg thiaminu; 1 mg D-biotinu; 10 ml BME Vitamin 100x solution; 100 μl 10 000x ampicilin; destilovaná H_2O do celkového objemu 1000 ml.
- pufr pro NMR měření: 10 mM HEPES, pH 6,5, 50 mM NaCl, 0,01% NaN_3

Expres byla provedena v 3 x 0,5 l M9 média, do každé z lahví bylo přidáno 500 μl 10 000x ampicilinu. K zaočkování byla použita kultura *E. coli* BL21(DE3)RIL transformovaná vektorem pSUMO, která byla připravena již dříve v průběhu exprese neznačeného proteinu (viz kapitola 3.4.).

Expres a následná purifikace byly provedeny obdobně jako v případě neznačeného proteinu (viz kapitoly 3.4 a 3.5). Po štěpení a oddělení fúzního SUMO proteinu ze směsi byl roztok HDD domény dialyzován (postupem popsáným v kapitole 3.5.2.), jako dialyzační pufr byl použit pufr pro měření NMR. Roztok proteinu byl zahuštěn na koncentraci cca 450 mM na centrifugační dialyzační koloně 7000 MWCO a byla k němu přidána deuteriová voda k dosažení poměru 5 % D_2O /95 % H_2O .

3.7. Polyakrylamidová vertikální SDS elektroforesa

- Elektrodový pufr: 25 mM Tris/HCl, 250 mM glycín, 0,1% SDS, pH 6,8
- 6x vzorkový pufr: 350 mM Tris/HCl, pH 6,8, 30 % (v/v) glycerol, 350 mM SDS, 4 % (v/v) 2 mM 2-merkaptóethanol, 180 μM bromfenolová modř
- 6 % gel: 250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 6,6 % akrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS
- 18 % gel: 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 18 % akrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS

SDS elektroforesa byla využita k analýze vzorků z exprese a purifikace HDD domény. 100 μ l vzorku bylo smícháno s 20 μ l 6x vzorkového pufru a následně zahříváno na 96 °C v suché míchací lázni Thermocell Mixing Block MB102. Elektroforesa byla prováděna ve vertikálním provedení, při napětí 140 V po dobu 110 min.

K následné vizualizaci proteinů v gelu byly používány dvě různé metody. První z nich je barvení stříbrem, prováděné následovně:

- 1) Fixace: 12 % (v/v) kyselina octová, 50 % (v/v) methanol, 0,02 % (v/v) formaldehyd, po dobu 30 min
- 2) Promývání: 50 % (v/v) methanol po dobu 15 min (3x opakováno)
- 3) Redukce: 0,02 % (w/v) thiosíran sodný po dobu 1 min
- 4) Promývání: deionizovaná voda po dobu 20 s (3x opakováno)
- 5) Impregnace: 0,2 % (w/v) dusičnan stříbrný, 0,02 % (v/v) formaldehyd, po dobu 20 min
- 6) Promývání: deionizovaná voda, po dobu 20 s (3x opakováno)
- 7) Vyvolání: 566 mM uhličitan sodný, 16 μ M thiosíran sodný, 0,02 % (v/v) formaldehyd, prováděno do objevení proužků proteinů v gelu
- 8) Promývání: deionizovaná voda, po dobu 20 s (3x opakováno)
- 9) Zastavení vyvolávání: (12 % (v/v) kyselina octová, 50 % (v/v) methanol, po dobu 10 min

Druhou využitou metodou je barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), prováděné následovně:

- 1) Barvení: gel umístěn do barvicího roztoku o složení 50% methanol, 10% kyselina octová, 0,2% CBB G-250 po dobu 10 min
- 2) Promývání: gel umístěn do odbarvovacího roztoku o složení 50% methanol, 10% kyselina octová po dobu 3 x 1h, s výměnou odbarvovacího roztoku mezi intervaly
- 3) Uchování: gel přemístěn do uchovávacího roztoku 7% kyseliny octové

3.8. Stanovování koncentrace proteinu

Stanovování koncentrací vzorků proteinů bylo prováděno dle Bradfordové [102] s použitím Coomassie Brilliant Blue G-250. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin.

3.9. Analýza struktury HDD domény v roztoku prostřednictvím NMR spektroskopie

3.9.1. Měření spekter

- pufr pro NMR měření: 10 mM HEPES, pH 6,5, 50 mM NaCl, 0,01% NaN₃

Pro strukturní analýzu byla naměřena řada spekter: ¹H/¹⁵N HSQC, HNCO, HNCACO, HNCACB, CBCA(CO)NH, HCCH TOCSY, ¹⁵N NOESY, ¹³C NOESY, ¹⁵N TOCSY, 2-D TOCSY a 2-D NOESY spektra.

Veškerá měření byla provedena Václavem Veverkou a Rozálií Hexnerovou na ÚOCHB AV ČR v.v.i. s 350 µl ¹⁵N/¹³C značeného vzorku HDD domény o koncentraci 0,45 M v pufru pro NMR měření s přídavkem deuteria v poměru 5 % D₂O/95 % H₂O (příprava viz 3.6.). K měření byl použit 850MHz spektrofotometr Bruker Avance (Bruker BioSpin GmbH, Germany) vybavený trojitě resonanční (¹⁵N/¹³C/¹H) kryosondou. Měření probíhala při teplotě 25 °C.

3.9.2. Přiřazení resonancí hlavního řetězce

¹H/¹⁵N HSQC, HNCO, HNCACO, HNCACB a CBCA(CO)NH spektra byla využita k manuálnímu přiřazení resonancí hlavního proteinového řetězce v programu Sparky (Goddard a Kneller, UCSF).

K přiřazení byla využita funkce „Strip plot“ v programu Sparky. Princip přiřazení signálů hlavního řetězce je následující: ¹H/¹⁵N HSQC spektrum zobrazuje maxima odpovídající HN skupině v peptidové vazbě jednotlivých aminokyselin. HNCO spektrum zobrazuje signál karbonylového uhlíku hlavního řetězce pro dané HN maximum, HNCACO spektrum zobrazuje krom signálu karbonylu pro danou aminokyselinu ještě signál karbonylu na předchozí aminokyselině. Obdobně CBCA(CO)NH spektrum zobrazuje signály α a β uhlíku pro dané HN maximum, HNCACB spektrum zobrazuje krom signálu α a β uhlíku pro dané HN maximum i signál α a β uhlíku předcházející aminokyseliny. K identifikaci HN maxim jednotlivých aminokyselin se využívá faktu, že signály α a β uhlíku jsou pro některé aminokyseliny do určité míry charakteristické a rozpoznatelné. Krom toho uspořádání spekter umožňuje i postupné přiřazování aminokyselin na základě jejich následnosti v řetězci, čehož je hojně využíváno u aminokyselin s necharakteristickými signály α a β uhlíku.

3.9.3. Přiřazení resonancí postranních řetězců

Další uvedená spektra byla vyřešena Rozálií Hexnerovou a Václavem Veverkou. HCCH TOCSY, ^{15}N NOESY, ^{13}C NOESY a ^{15}N TOCSY spektra byla využita k přiřazení resonancí alifatických postranních řetězců. 2-D TOCSY a 2-D NOESY spektra byla využita k přiřazení resonancí aromatických postranních řetězců. Tato data byla zpracována a v kombinaci s přiřazenými resonancemi hlavního řetězce využita k výpočtu 3D struktury HDD domény Václavem Veverkou a Rozálií Hexnerovou.

3.9.4. Porovnání struktury HDD domény s homologními doménami

Hotový 3D model HDD domény byl dále využit k jejímu strukturnímu srovnání se Sti1-podobnou doménou Rad23 (PDB kód 2F4M), s XPC-vázající doménou lidského hHR23A (PDB kód 1TP4) a s HDD doménou kvasinkového Ddi1 [95]. Analýza byla provedena pomocí programu Pymol (PyMOLTM 1.30), který provedl superpozice a výpočty odchylek kvadratických průměrů meziatomových vzdáleností (RMSD, z *angl.* Root Mean Square Deviation).

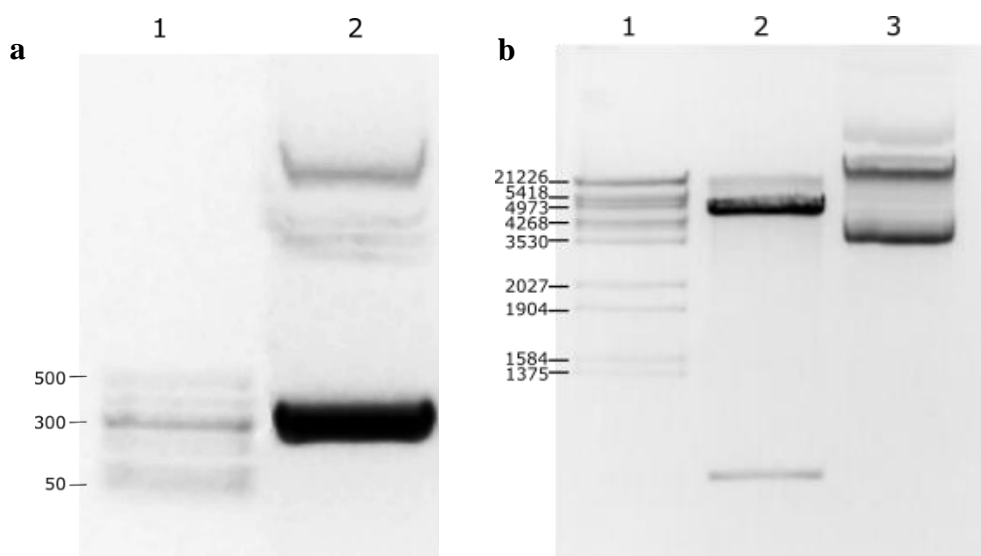
4 Výsledky

HDD doména lidského Ddi2 byla zaklonována do pSUMO vektoru, exprimována v *E. coli* v klasickém LB médiu i izotopově značeném M9 médiu a purifikována. $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ značená HDD doména byla následně využita ke strukturním studiím pomocí NMR.

4.1. Zaklonování HDD domény lidského Ddi2 do vektoru pSUMO

4.1.1. PCR reakce

Byla provedena PCR reakce pro namnožení a izolaci sekvence kódující HDD doménu z genu pro kompletní lidské Ddi2. Volbou primerů byla vnesena štěpná místa pro restriční endonukleasy *Bam*HI a *Xho*I na konce sekvence, umožňující její následné zaligování do pSUMO vektoru. Výsledky byly ověřeny prostřednictvím agarosové horizontální elektroforesy. Postup práce je popsán v kapitolách 3.3.1. až 3.3.3. Výsledky elektroforesy jsou zobrazeny na Obrázku 6a.



Obrázek 6. (a) Analýza produktů PCR reakce na agarosovém gelu. Dráha 1 – standard Gel Pilot 50 bp (QIAGEN) s popisky příslušného počtu bazí, dráha 2 – výsledek PCR reakce, 313 párů bazí (b) Průběh ligace HDD domény do pSUMO vektoru. Dráha 1 – Lambda DNA standard s vyznačenými velikostmi v kilobazích, dráha 2 – vektor pSUMO po štěpení endonukleasami, dráha 3 – výsledek ligace sekvence HDD domény do pSUMO vektoru.

4.1.2. Ligace sekvence HDD domény do pSUMO vektoru

Vektor pSUMO a produkt předchozí PCR reakce byly naštěpeny *Bam*HI a *Xho*I endonukleasami, naštěpený vektor byl defosforylován a obě sekvence byly následně

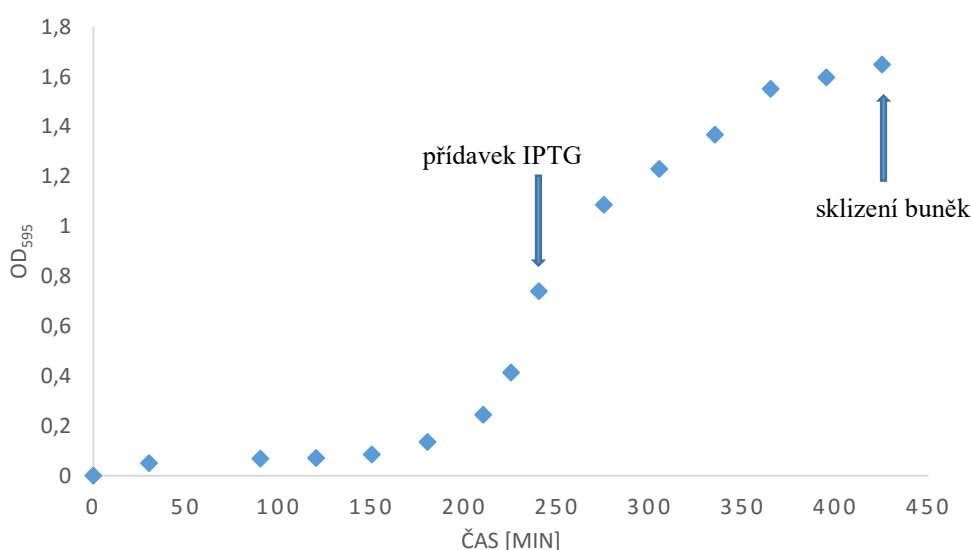
ligovány T4 ligasou. Postup je popsán v kapitole 3.3.5. Štěpení vektoru a výsledek ligační reakce byl analyzován horizontální agarosovou elektroforesou, jejíž výsledek je zobrazen na Obrázku 6b (str. 40). Zaligovaný vektor byl namnožen v bakteriích a vyčištěn, postup popsán v kapitole 3.3.7. Výsledný roztok vektoru o objemu 30 μ l měl koncentraci 132 μ g/ml.

4.2. Exprese HDD domény v *E. coli* a její purifikace

Expresa a purifikace HDD domény byla nejprve vyzkoušena na neznačeném proteinu, až poté byl protein exprimován v médiu značeném isotopy. V kapitolách 4.2.1. až 4.2.5. je uvedena modelová purifikace vzhledem k faktu, že byl pro značený i neznačený protein použit stejný protokol.

4.2.1. Růstová křivka exprese

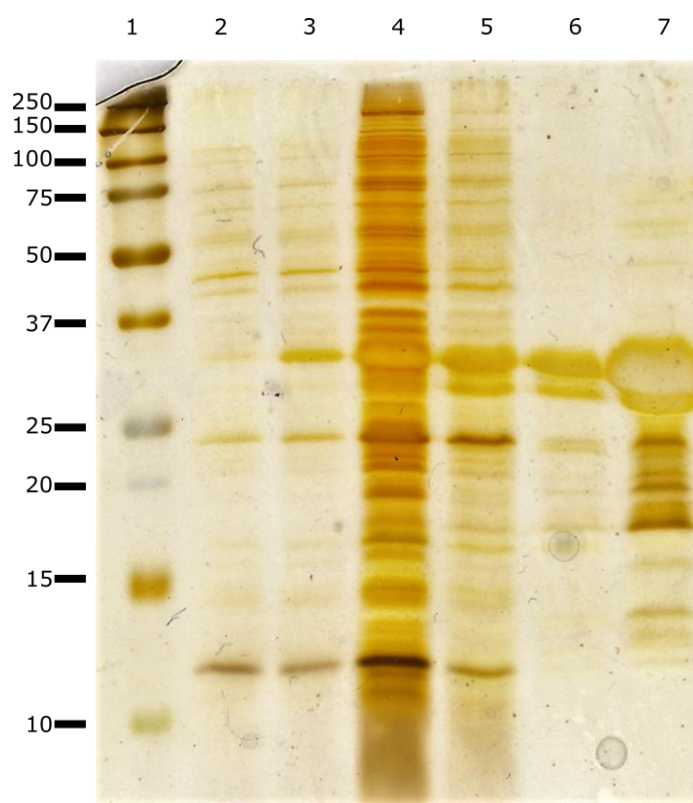
HDD doména lidského Ddi2 byla exprimována v bakteriálním kmenu BL21(DE3)RIL. Popis postupu se nachází v kapitole 3.4. Ke sledování průběhu exprese byla využita optická hustota při 595 nm (OD_{595}). Změny OD_{595} v průběhu kultivace jsou znázorněny na Obrázku 7. Když OD_{595} dosáhlo přibližně hodnoty 0,7, byla kultura indukována pomocí IPTG. Kultura byla sklizena 3 h 15 min po indukci. Byla získána peleta o hmotnosti 8 g. Těsně před indukcí a těsně před sklizením byl z kultury odebrán malý vzorek pro SDS elektroforesu, kterou bylo ověřeno, zda došlo k indukci exprese proteinu z pSUMO vektoru. Elektroforesa byla provedena postupem popsáním v kapitole 3.7. K vizualizaci bylo použito barvení stříbrem. Výsledek této analýsy je zobrazen na Obrázku 8 (str. 42).



Obrázek 7. Bakteriální růstová křivka *E. coli* v průběhu exprese HDD domény. Bod indukce pomocí IPTG a bod sklizení buněk jsou označeny šipkou s popiskem.

4.2.2. Analýza exprese a purifikace

Exprimovaný protein byl z buněk izolován postupem popsáným v kapitole 3.5.1. V průběhu purifikace byly odebrány následující vzorky pro pozdější SDS elektroforetickou analýsu: supernatant po inkubaci s resinem, supernatant po prvním a druhém promývání resinu promývacím pufrem, supernatant po inkubaci resinu s elučním pufrem. S nimi byly na stejném gelu analyzovány vzorky kultury před indukcí a po indukcí (viz kapitolu 4.2.1.). SDS elektroforesa byla provedena postupem popsáným v kapitole 3.7. K vizualizaci bylo použito barvení stříbrem. Výsledek SDS elektroforesy je zobrazen na Obrázku 8.

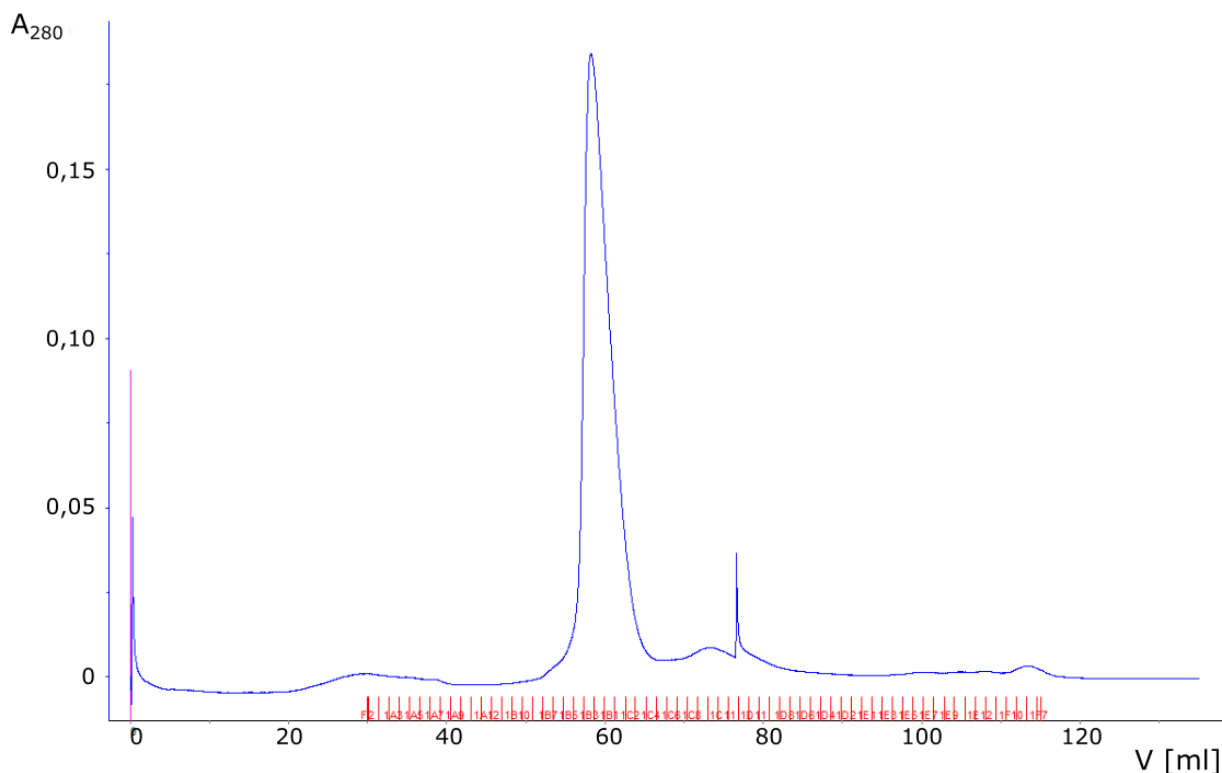


Obrázek 8. SDS elektroforesa mapující průběh purifikace exprimovaného proteinového konstruktu. Dráha 1 – 2 μ l All blue standard molekulových hmotností s popiskem hmotnosti v kDa, dráha 2 – 6 μ l vzorek kultury před indukcí přidavkem IPTG, dráha 3 – 3 μ l vzorek kultury po indukcí, dráha 4 – 3 μ l supernatant po inkubaci s resinem, dráha 5 – 3 μ l supernatant z prvního promývání, dráha 6 – 3 μ l supernatant z druhého promývání, dráha 7 – 3 μ l vzorek proteinu po eluci z resinu.

4.2.3. Gelová filtrace a štěpení SUMO proteasou

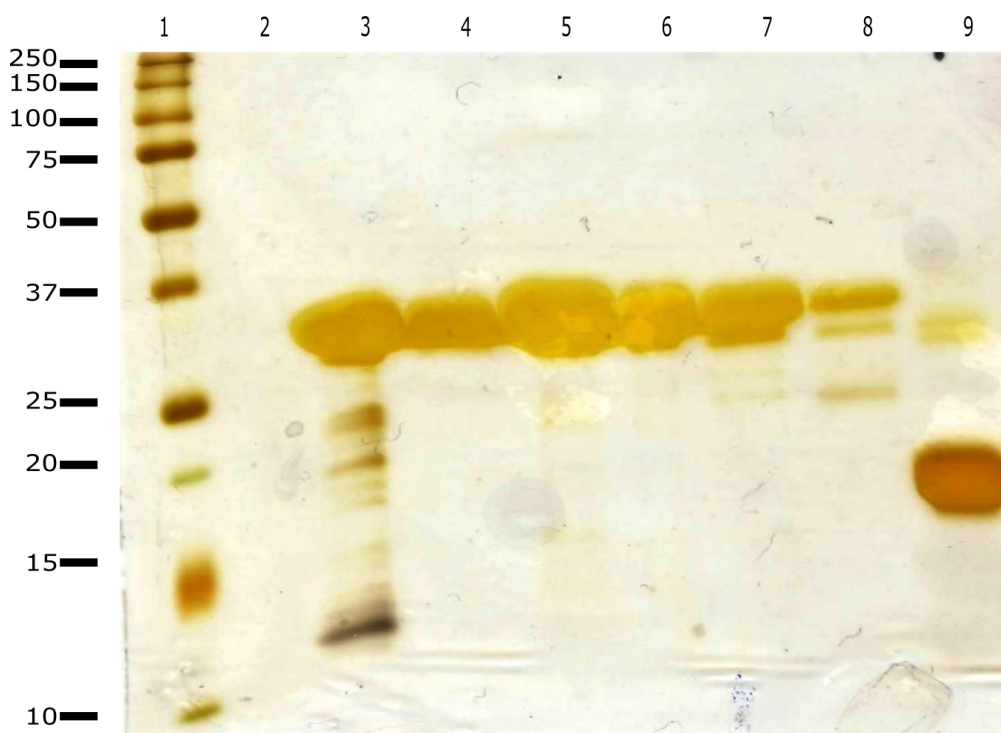
Po purifikaci pomocí histidinové kotvy byl protein dialyzován a zbytkové nečistoty byly následně odděleny pomocí gelové filtrace. Postup je popsán v kapitolách 3.5.2. a 3.5.3.

Průběh chromatografie byl sledován pomocí absorpance roztoku při 280 nm (A_{280}). Záznam změn A_{280} v průběhu chromatografie je zobrazen na Obrázku 9.



Obrázek 9. Záznam průběhu gelové filtrace, sledovaný pomocí absorpance při 280 nm vztažené k objemu proteklého rozpouštědla. Fialově – bod nástřiku vzorku na kolonu, modře – absorpance při 280 nm v absorbančních jednotkách, červeně – vyznačení jímaných frakcí.

Na základě údajů z chromatogramu byly vybrány frakce B1, B2, B3, C1 a C2 jako frakce obsahující purifikovaný protein. Z těchto frakcí byly odebrány vzorky pro následnou SDS elektroforesu. Frakce byly poté spojeny a fúzní protein v nich obsažený byl štěpen pomocí SUMO proteasy (viz kapitola 3.5.4.). Po naštěpení byl ze vzorku odebrán vzorek pro SDS elektroforesu. Všechny vzorky byly následně analyzovány SDS elektroforesou podle postupu z kapitoly 3.7. Bylo použito barvení stříbrem. Výsledek SDS elektroforesy je zobrazen na Obrázku 10 (str. 44).

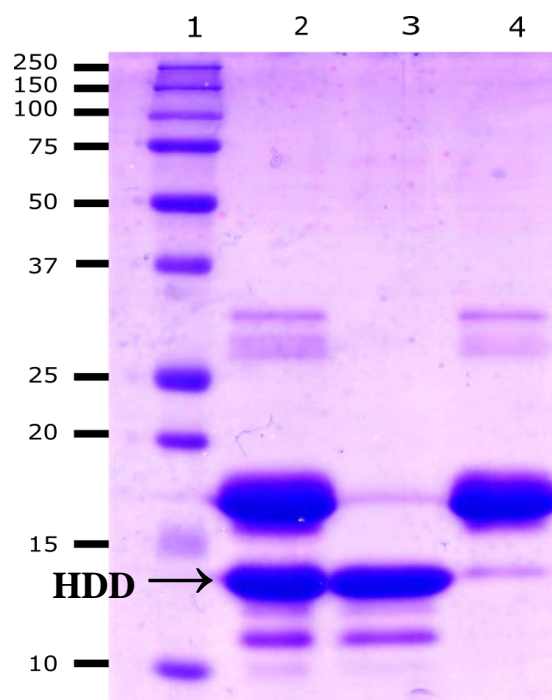


Obrázek 10. SDS elektroforesa mapující průběh gelové filtrace a odštěpení fúzního SUMO proteinu. Dráha 1 – All blue standard molekulových hmotností s popiskem hmotnosti v kDa, dráha 2 – bez vzorku, dráha 3 – vzorek proteinu, který byl nanesen na kolonu, dráha 4 - frakce B3, dráha 5 - frakce B2, dráha 6 - frakce B1, dráha 7 - frakce C1, dráha 8 - frakce C2, dráha 9 – produkt štěpení SUMO proteasou.

4.2.4. Analýza purifikace HDD po odštěpení fúzního proteinu

Po ukončení štěpení byla HDD doména izolována ze směsi postupem popsáním v kapitole 3.5.4. Během purifikace byly odebrány následující vzorky pro SDS elektroforesu: směs proteinů před purifikací, supernatant po inkubaci s resínem (obsahující HDD doménu), supernatant po inkubaci resinu s elučním pufrem (obsahující SUMO a SUMO proteasu). SDS elektroforesa byla provedena podle postupu v kapitole 3.7. K barvení bylo použito CBB G-250, protože se ukázalo, že HDD doménu nelze obarvit pomocí stříbra. Výsledek je zobrazen na Obrázku 11 (str. 45).

Výsledné množství získaného proteinu po expresi v LB médiu bylo 5,4 mg o výtěžku 1,8 mg na litr média. Expresí v M9 bylo získáno 1,7 mg izotopově značeného proteinu o výtěžku 1,1 mg na litr média.



Obrázek 11. SDS elektroforesa mapující štěpení SUMO proteasou. Dráha 1 – All blue standard molekulových hmotností s popiskem hmotnosti v kDa, dráha 2 – směs proteinů vzniklá štěpením konstruktu SUMO proteasou, dráha 3 – supernatant po inkubaci s resinem, dráha 4 – eluát z resinu. Proužek odpovídající HDD doméně je vyznačen šipkou s popiskem.

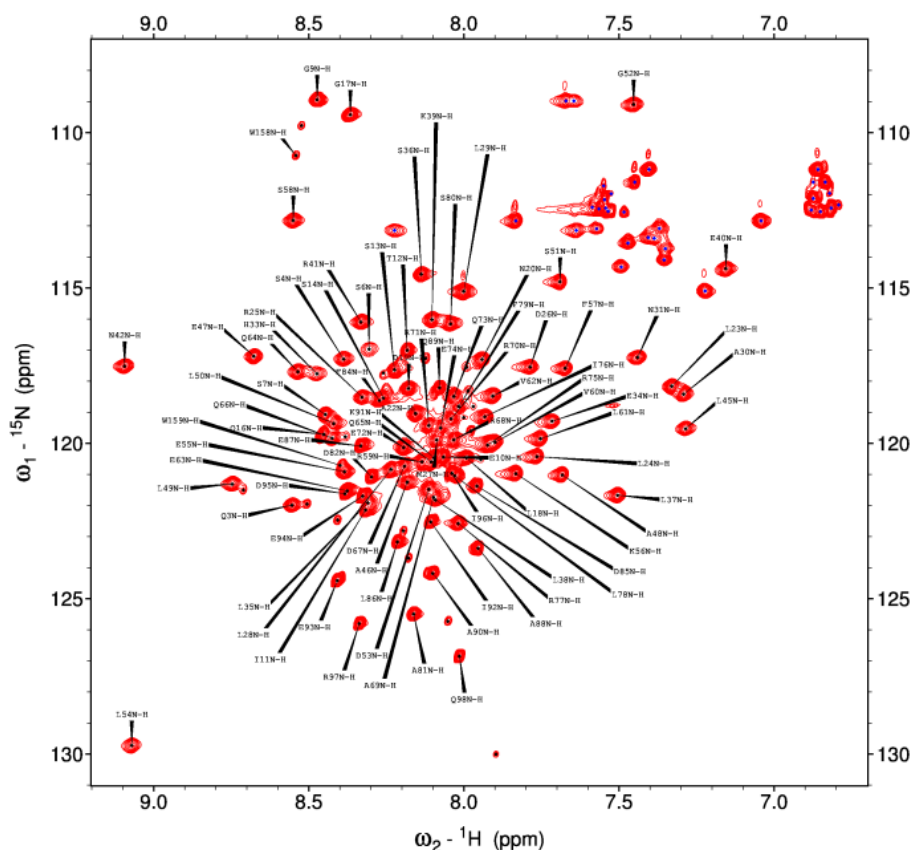
4.3. Strukturní analýza pomocí NMR spektroskopie

4.3.1. Přiřazení resonancí hlavního řetězce

Bylo provedeno téměř kompletní přiřazení resonancí hlavního řetězce, s výjimkou prvních dvou N-koncových aminokyselin Ser1 a Gln2. Postup přiřazení resonancí je popsán v kapitole 3.9.2. K přiřazení resonancí hlavního řetězce byla využita spektra $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC, HNC0, HNCAC0, HNCACB a CACB(CO)NH., jejichž manuální přiřazení v programu Sparky (Goddard and Kneller, USCF) provedl Jakub Staníček. Kompletní přiřazené $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC spektrum je zobrazené na Obrázku 12 (str. 46). Naměření spekter bylo provedeno Václavem Veverkou z ÚOCHB AV ČR, v.v.i..

4.3.2. Struktura

Přiřazené resonance hlavního řetězce byly spolu s dalšími spektry (viz kapitola 3.9.3) využity při výpočtu struktury Václavem Veverkou a Rozálií Hexnerovou. Strukturní úhly v programech Cyana, TALON+ a YASARA vyprodukovaly množinu podmínek, které byly dále využity k modelování struktury. Využité strukturní podmínky jsou shrnuty v Tabulce 6 (str. 46).



Obrázek 12. Kompletní $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC spektrum HDD domény se signály přiřazenými jednotlivým aminokyselinám. Modře označené signály náležejí postranním skupinám lysinů, signály hlavního řetězce jsou označeny podle aminokyseliny, jíž přísluší.

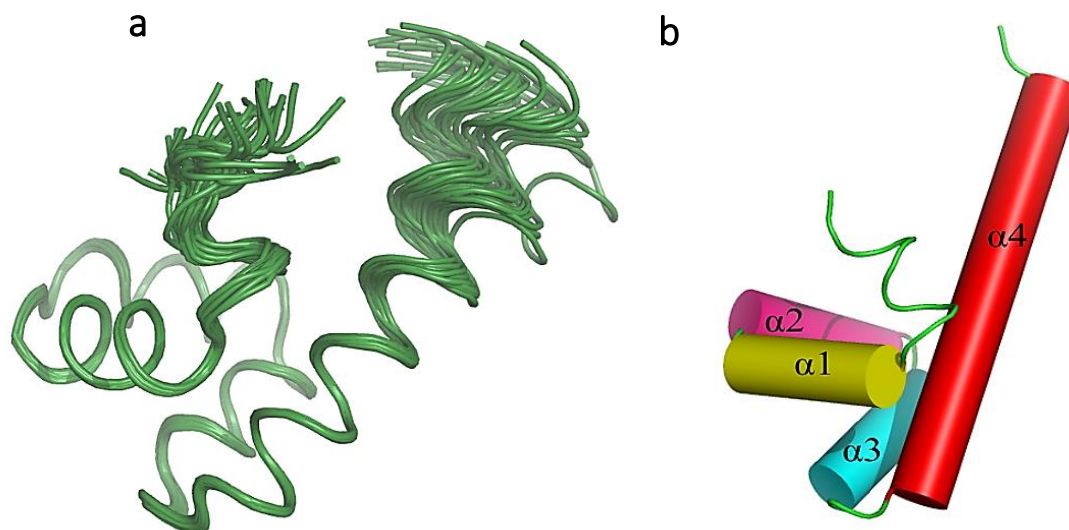
Tabulka 6. Podmínky využití pro modelování struktury HDD domény Ddi2: vzdálenosti a úhlová omezení

Vzdálenostní omezení		
Souhrn signálů pro NOE	1894	
Sekvenční ($ i-j = 1$)	522	
Středně vzdálené ($ i-j < 4$)	593	
Vzdálené ($ i-j > 5$)	292	
Celková úhlová omezení	108	
úhly ϕ	54	
úhly ψ	54	
Shrnutí Ramachandranova diagramu		
Přednostně zaujímané regiony	93,9%	
Povolené regiony	6,0%	
Výjimečně povolené regiony	0,1%	
Nedovolené regiony	0,0%	
Průměrné párované RMSD pro elipsoidy prvního řádu* (Å)	<i>strukturovaná část^a</i>	<i>všechna residua</i>
Těžké atomy	4,8	8,1
Hlavní řetězec	4,5	7,8

* K výpočtu RMSD bylo využito 30 struktur

^a rozsah pro strukturovanou část – skupiny s definovanými parametry torzních úhlů $S(\phi)+S(\psi)>1,8$

Z množiny struktur vyprodukovaných výpočty bylo vybráno 30 o nejnižší energii, které jsou zobrazeny na Obrázku 13a.



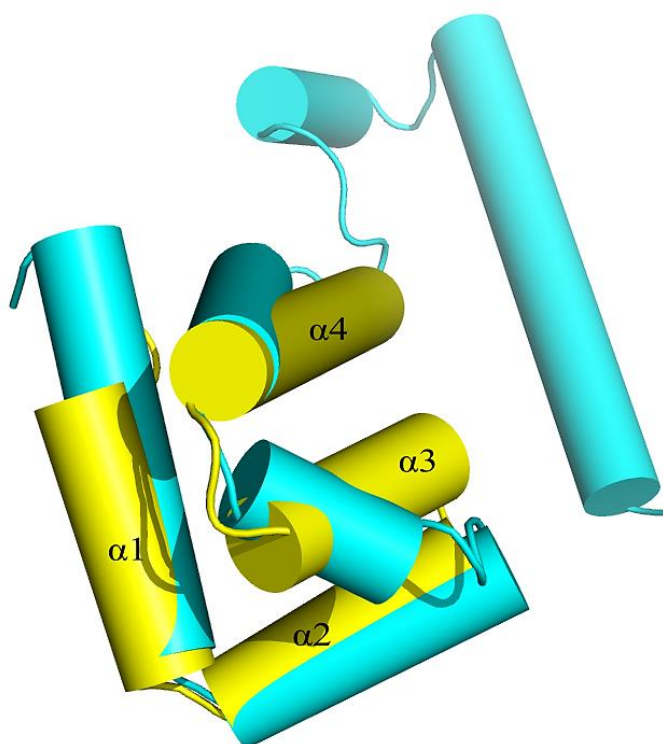
Obrázek 13. Výsledek strukturní analýzy HDD domény. Jsou zobrazeny pouze aminokyseliny Ser127 - Arg189 tvořící strukturovanou část. Obrázek (a) znázorňuje 30 výsledných struktur hlavního řetězce, splňujících prostorová omezení při výpočtu. V obrázku (b) jsou vyznačené helikální úseky, barevně odlišené následovně: žlutá – helix α_1 , růžová – helix α_2 , modrá – helix α_3 , červená – helix α_4 , zelená – nestrukturované oblasti. Obrázky byly vytvořeny v programu PyMOL (1.30).

Strukturní analýza odhalila, že struktura HDD domény se skládá ze čtyř α -helixů, jak je zvýrazněno na Obrázku 13b, které na sebe těsně nasedají a tvoří svazek. Helixy a jejich polohy jsou následující: α_1 (Pro136 – Ala145), α_2 (Pro147 – Arg156), α_3 (Pro158 – Ser166), α_4 (Leu169 – Arg192). Koncové sekvence v rozmezí aminokyselin Gln116 – Thr127 a Phe194 – Glu213 jsou vysoce nestrukturované. C-konec α_4 helixu je flexibilní. Svazek, tvořený helixy, je stabilizovaný jednak hydrofobními interakcemi leucinových postranních řetězců směřujících dovnitř svazek, a dále solným můstkem mezi Ser165 na helixu α_3 a Lys170 na helixu α_4 , s částečným přispěním Glu161. N-koncový úsek v rozmezí aminokyselin Ser128 – Asn135 vykazuje náznak helikálního uspořádání, nebyl nicméně programem PyMOL (1.30) rozpoznán jako α -helix.

4.3.3. Strukturní srovnání HDD domény s homologními doménami

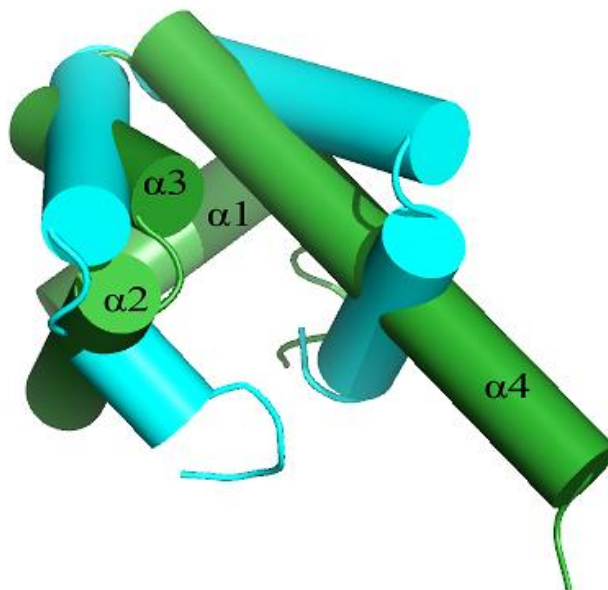
Získaná struktura HDD domény byla porovnána v programu PyMol™ se strukturami dalších domén: HDD domény Ddi1 ze *Saccharomyces cerevisiae* (vyřešené v laboratoři Jana Konvalinky a Kláry Grantz Šaškové) a dále Sti1-podobné domény lidského a kvasinkového homologu Rad23 (viz kapitola 1.3.5.). Pro vytvoření superpozice byla využívána funkce „super“.

Strukturní porovnání lidské HDD domény s kvasinkovou vykázalo hodnotu RMSD 3,553 Å. Grafické znázornění superpozice obou struktur je zobrazeno na Obrázku 14.



Obrázek 14. Strukturní porovnání HDD domén ze *Saccharomyces cerevisiae* (modře) a člověka (žlutě) vygenerované programem PyMol™. Helixy lidské HDD domény nesou popisek $\alpha 1$ - $\alpha 4$. RMSD pro danou superpozici bylo vypočteno jako 3,533 Å, do výpočtu bylo zahrnuto 288 atomů.

Další porovnání bylo provedeno se Sti1-podobnou doménou Rad23 ze *Saccharomyces cerevisiae*. Strukturovaná část HDD domény byla srovnána se sekvencí Rad23 v rozmezí Pro275 – Gln321. Vypočtené RMSD bylo 4,605 Å pro 187 porovnávaných atomů. Výsledek superpozice je znázorněn na Obrázku 15 (str. 49).



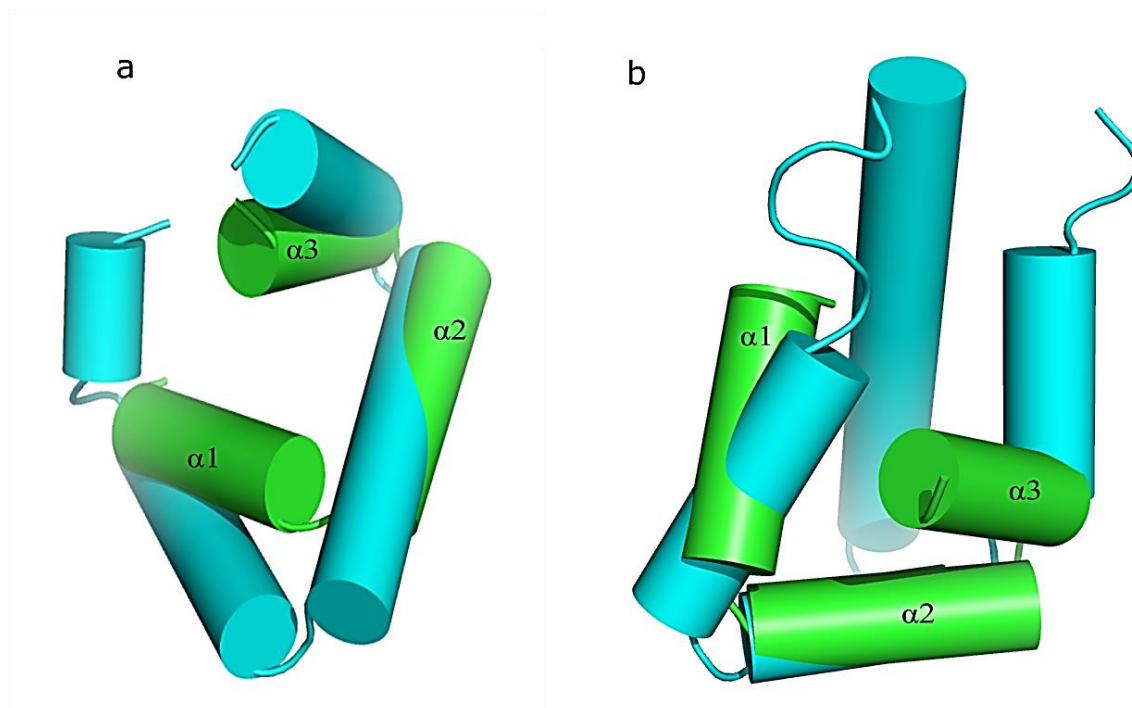
Obrázek 15. Strukturní porovnání lidské HDD domény (zeleně) se Stl1-podobnou doménou Rad23 ze *Saccharomyces cerevisiae* (modře). Helixy lidské HDD domény nesou popisek $\alpha 1$ - $\alpha 4$. RMSD pro danou superpozici bylo vypočteno jako 4,605 Å, do výpočtu bylo zahrnuto 187 atomů.

Strukturovaná část HDD domény byla také srovnána se sekvencí lidského homologu Rad23 v rozmezí Asn230 – Pro288, kde se nachází XPC-vázající doména patřící rovněž do rodiny Stl1-podobných proteinů. Vypočtené RMSD bylo 9,368 Å pro 330 porovnávaných atomů.

Srovnání Stl1-podobných domén lidského i kvasinkového homologu Rad23 bylo provedenou rovněž se zkrácenou verzí HDD domény rozmezí aminokyselin Pro135 - Ser165.

Pro superpozici prvních tří helixů HDD domény s XPC vázající doménou lidského homologu Rad23 vypočítal program PyMol hodnotu RMSD 4,425 Å pro 153 porovnávaných atomů. Superpozice je zobrazena na Obrázku 16a (str. 50).

Pro superpozici prvních tří helixů HDD domény s XPC vázající doménou lidského homologu Rad23 vypočítal program PyMol hodnotu RMSD 3,281 Å pro 181 porovnávaných atomů. Superpozice je zobrazena na Obrázku 16b (str. 50).



Obrázek 16. Porovnání lidské HDD (zeleně) s doménami ze Stt1-podobné rodiny (modře). Jednotlivé helixy lidské HDD domény jsou popsány $\alpha1$ - $\alpha3$. Obrázek (a) znázorňuje srovnání HDD domény se Stt1-podobnou doménou Rad23 ze *S. cerevisiae*. Vypočtené RMSD je 4,425 Å, do výpočtu bylo zahrnuto 153 atomů. Obrázek (b) znázorňuje srovnání HDD domény s XPC-vázající doménou lidského homologu Rad23. Vypočtené RMSD je 3,281 Å, do výpočtu bylo zahrnuto 181 atomů.

5 Diskuze

Ddi2 je lidský protein s neobvyklou dimerizující doménou RVP, jejíž struktura je příbuzná aspartátovým proteasám retrovirů. Ačkoli se ze struktury RVP domény zdá, že by s velkou pravděpodobností mohla být rovněž funkční proteasou, nebyl dosud pro Ddi2 ani pro většinu z jeho homologů v dalších organismech nalezen žádný fyziologický substrát a buněčná funkce Ddi2 tak nadále zůstává záhadou. Z homologů lidského Ddi2 je nejlépe prozkoumaná funkce jeho homologu Ddi1 ze *S. cerevisiae*, jenž patří do rodiny UBL/UBA proteinů, regulujících degradaci ubikvitinovaných substrátů v proteasomu. V průběhu evoluce savců však u homologů Ddi1 došlo ke ztrátě UBA domény, tudíž funkce lidského Ddi2 jako adaptoru v ubikvitin-proteasomovém systému je nejistá.

Důležitým krokem k porozumění funkci proteinu Ddi2 je rozklíčování funkce jeho jednotlivých domén. Za tímto účelem byly provedeny strukturní predikce a analýsy, kterými byla identifikována helikální oblast sousedící s N-koncem RVP domény. Tato helikální část byla pojmenována HDD doména a byla pro ni předpovězena strukturní homologie s rodinou Sti1-podobných domén. Její existence byla predikována jak u lidské Ddi2, tak u kvasinkové Ddi1. Protože Sti1-podobné domény často fungují jako moduly zprostředkovávající protein-proteinové interakce, byla navržena teorie, že HDD doména by mohla plnit funkci v rozpoznávání proteolytických substrátů pro RVP doménu, případně zprostředkovávat jinou regulační interakci. Sti1-podobné domény se navíc vyskytují i v proteasomových adaptorech Rad23 a Dsk2 a případná podobnost by mohla představovat funkční spojitost. Pro zlepšení představy o roli HDD domény byla pomocí NMR spektroskopie vyřešena její struktura.

Oblast genu pro Ddi2 pro proteinovou sekvenci od Gln116 do Gln212 byla namnožena pomocí PCR reakce. Výsledný produkt i s přidanými štěpnými místy pro restriční endonukleasy měl velikost 313 bazí, což souhlasí s velikostí proužku na gelu na Obrázku 5a. Poté, co byla namnožená sekvence naštěpena restričními endonukleasami, byla zaligována do vektoru pSUMO. Průběh ligace byl analyzován pomocí agarosové elektroforesy, která je znázorněna na Obrázku 5b. V dráze dva je vidět vektor po naštěpení restričními endonukleasami: DNA má lineární formu, jak je patrné z jejího putování v jediném proužku, níže na gelu je pak vidět fragment, který se nacházel mezi štěpnými místy obou endonukleas a byl tak od zbytku vektoru oddělen. V dráze tři je vidět produkt ligace: z typického dvojitého proužku je vidět, že DNA je cirkulární a tvoří superhelikální struktury. Pro ujištění, že do vektoru byla zaligována správná DNA, či zda nedošlo k jiné chybě, byl před dalším využitím vektor s HDD doménou odeslán k sekvenování, které potvrdilo úspěšný průběh klonování.

Jako expresní systém pro produkci HDD domény byla využita *E. coli*. Expresní systém pSUMO vektoru využívá ampicilinovou resistenci a indukci exprese pomocí IPTG. Exprese a purifikace byla nejprve provedena v LB médiu pro ověření postupu, následně i v médiu obohaceném o izotopy ^{13}C a ^{15}N . Vzhledem k identickým protokolům obou purifikací jsou výsledky uvedeny pouze jednou, rovněž diskuze exprese a purifikace se vztahuje k oběma využitým médiím.

Jak je vidět na Obrázku 8 při porovnání buněčných lysátů před a po indukci, indukce proběhla úspěšně, což lze usoudit dle objevení nového silného proužku o velikosti cca 30 kDa ve vzorku po indukci, který odpovídá velikosti fúzního proteinu Ddi2 HDD se SUMO. Na Obrázku 8 je dále vidět, že následnou chelatační chromatografií byl přes polyhistidinovou kotvu tento protein purifikován. Po prvním kroku nebyl z lysátu oddělen všechny indukovaný protein, supernatant byl tedy uschován pro další kolo chelatační chromatografie. Část proteinu navázaného na resin byla ztracena během promývání, jak je vidět ve vzorcích odebraných po promytí. Protein byl nicméně získán v dostatečném množství, mírně znečištěný dalšími proteiny, které se zřejmě nespecificky vázaly na resin.

Tyto nečistoty byly odděleny v dalším purifikačním kroku, kterým byla gelová filtrace. Jak je vidět na Obrázku 10, znečištění přítomné ve vzorku naneseném na kolonu není přítomné v analyzovaných frakcích, sesbíraných po skončení filtrace. Frakce B3 a B1 obsahují protein o vysoké čistotě, frakce B2 a C1 jsou mírně znečištěné a frakce C2 obsahuje poměrně výrazný proužek neznámé nečistoty. Množství nečistot však bylo shledáno jako dostatečně malé pro další použití, všechny frakce proto byly spojeny a dále využity.

Výsledek odštěpení fúzního proteinu je vidět na Obrázku 10, kde je obarvený stříbrem. Velký viditelný proužek o velikosti cca 17 kDa patří odštěpenému proteinu SUMO, slabší proužek o velikosti přibližně 30 kDa patří SUMO protease. Rozštěpení konstruktů je patrné na změně velikosti produktů v porovnání s vedlejšími drahami obsahujícími nerozštěpený konstrukt. HDD doména není na tomto gelu vidět, protože jak se ukázalo, není ji možné obarvit stříbrem, pravděpodobně v důsledku vysoce helikální struktury.

Směs štěpných produktů je znovu obarvena na Obrázku 11, zde pomocí CBB G-250. Jak je vidět, proužky SUMO proteasy i odštěpeného SUMO proteinu se nacházejí na stejných pozicích, navíc se objevuje proužek HDD domény o velikosti cca 13 kDa. Na obrázku je dále vidět oddělení HDD domény od SUMO proteinu a SUMO proteasy, kde HDD doména zůstala při inkubaci s resinem v supernatantu, zatímco SUMO protein a SUMO proteasa byly navázány na resin přes své polyhistidinové kotvy.

Takto purifikovaná HDD doména značená izotopy ^{13}C a ^{15}N byla dále využita k určení struktury pomocí NMR spektroskopie. Měření spekter, jejich analýsa a následné výpočty byly provedeny Václavem Veverkou a Rozálií Hexnerovou na ÚOCHB AV ČR v.v.i.. Přiřazení signálů hlavního řetězce provedl Jakub Staníček.

Z výpočtů dle geometrických a vzdálenostních omezení byla určena množina 30 konvergentních struktur. Hodnota RMSD pro hlavní řetězec vyšla 4,5 Å. Z těchto struktur vyobrazených na Obrázku 13a je vidět, že velká část strukturované části v rozmezí Ser127 – Arg189 je tvořena čtyřmi helixy, což je v souladu s bioinformatickou predikcí. N-koncová část konstruktu HDD v rozmezí Ser128 – Asn135 sice netvoří přímo α -helix, nicméně má tendenci k helikálnímu uspořádání. Je možné, že tato část je rozvolněná v důsledku vysoce neuspořádané sousedící sekvence Gln116 – Thr127, a že v kompletním proteinu rovněž tvoří α -helix. Podobně vysoce mobilní konec helixu α_4 v rozmezí Glu180 – Arg189 může být důsledek neuspořádaného C-konce proteinu tvořeného zbytky Phe194 – Glu213, který svou vysokou mobilitou rozvolňuje jeho strukturu. O částech sekvence v rozmezí Gln116 – Thr127 a Phe194 – Glu213 je nemožné dělat ze strukturního hlediska jakékoli závěry, protože v důsledku izolace HDD domény od zbytku proteinu zřejmě ztratily interakce, které je stabilizovaly, v důsledku čehož se volně pohybují v roztoku.

Data získaná pomocí NMR byla využita k porovnání struktury lidské HDD s dalšími proteinovými doménami. Největší podobnost byla zjištěna u HDD domény z *S. cerevisiae*, kde se poměrně dobře shoduje poloha prvních čtyř helixů v obou doménách. RMSD pro superpozici těchto struktur vyšlo 3,533 Å, vypočtené pro 288 atomů. Kvasinková HDD doména ovšem za nestrukturovaným spojovníkem nese na C-konci další helikální část, která se u lidské varianty nevyskytuje.

Další porovnání se Sti1-podobnými doménami lidského a kvasinkového homologu Rad23 vyústilo pouze v superpozici s vyššími hodnotami RMSD: 4,605 Å na 187 atomech pro kvasinkový a výrazných 9,368 Å na 330 atomech pro lidský homolog Rad23. Hlavním prvkem komplikujícím superpozici zde byl dlouhý flexibilní helix α_4 , který nemá ve Sti1-podobných doménách obdobu. Funkce „*super*“ je určena s porovnání struktury na základě prostorového uspořádání a velké rozdíly ve tvaru molekul snižují její účinnost i v případě, že část molekul je strukturně obdobná. Struktura HDD byla proto zkrácena a k dalšímu srovnání byly využity pouze helixy α_1 – α_3 . Pro lidský homolog se se zkrácenou verzí podařilo provést výrazně lepší superpozici než s kompletní HDD doménou Ddi2, kde RMSD pokleslo až na 3,281 Å pro 181 atomů. U superpozice s kvasinkovou Sti1-podobnou

doménou to mělo na hodnotu RMSD jen velmi malý vliv, RMSD se snížilo na 4,425 Å pro 153 atomů, ale porovnání vyústilo v superpozici odlišných helixů než v předchozím případě.

Z celkového hlediska lze považovat za příbuzné lidskou a kvasinkovou HDD doménu, pro Sti1-podobné domény z obou homologů Rad23 lze o jisté podobnosti mluvit u svazku tvořeného prvními třemi helixy lidské HDD domény. To by mohlo napovídat o možné, již výše diskutované funkci HDD jako prostředníka protein-proteinových interakcí. Ta bude předmětem dalšího zkoumání.

6 Závěr

Cílem této práce bylo získat izotopově značenou HDD doménu lidského Ddi2, určit její strukturu pomocí NMR spektroskopie a na základě získaných dat ji porovnat s proteinovými doménami, u nichž bylo možné očekávat jistou strukturní podobnost.

Sekvence kódující HDD doménu lidského Ddi2 byla zaklonována do vektoru pSUMO. Tento vektor byl následně využit k transformaci bakterií *E. coli*. V nich byl následně exprimován požadovaný protein. Exprese byla provedena nejprve v LB médiu pro optimalizaci purifikačního postupu, následně byl protein exprimován v $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ značeném médiu pro získání izotopově značeného proteinu a purifikován dle ověřeného protokolu.

V bakteriích byl exprimován fúzní protein HDD domény a proteinu SUMO. Ten byl purifikován prostřednictvím chelatační chromatografie přes histidinovou kotvu na SUMO proteinu, dále s pomocí gelové filtrace. Z čistého proteinu byl odštěpen SUMO protein a odčištěn opět s pomocí chelatační chromatografie.

Získaná HDD doména obohacená o ^{13}C a ^{15}N byla využita k měření spekter pro určení struktury pomocí NMR spektroskopie. Sada 30 konvergentních struktur byla využita ke strukturnímu porovnání lidské HDD domény s HDD doménou *S. cerevisiae* a dále se Sti1-podobnými doménami lidského a kvasinkového homologu Rad23. Byla detekována podobnost lidské HDD domény s N-koncovou částí kvasinkové HDD, po porovnání s oběma Sti1-podobnými doménami Rad23 byla zjištěna podobnost především pro N-koncovou část HDD tvořenou třemi helixy. V pátrání po biologické funkci HDD domény lidského Ddi2 proteinu bude nadále pokračovat.

7 Literatura

1. de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. 1955. Tissue fractionation studies. 6. intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60(4):604–17
2. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. 1978. A heat-stable polypeptide component of an atp-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81(4):1100–1105
3. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. 1980. Atp-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77(3):1365–68
4. Hershko A. 1983. Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* 34(1):11–12
5. Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J. 2007. Rnf8 ubiquitylates histones at dna double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131(5):887–900
6. Hicke L, Riezman H. 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84(2):277–87
7. Ikeda F, Crosetto N, Dikic I. 2010. What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? *Cell* 143(5):677–81
8. Zhai L, Joo H-Y, Wang H. 2009. In vitro and in vivo assays for studying histone ubiquitination and deubiquitination. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 523:295–309
9. Komander D, Rape M. 2012. The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81:203–29
10. L N Johnson, Barford and D. 1993. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22(1):199–232

11. Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD. 1975. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry (Mosc.)*. 14(10):2214–18
12. Ozkaynak E, Finley D, Varshavsky A. 1984. The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* 312(5995):663–66
13. Wiborg O, Pedersen MS, Wind A, Berglund LE, Marcker KA, Vuust J. 1985. The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J.* 4(3):755–59
14. Baker RT, Board PG. 1987. The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the ub b subfamily. *Nucleic Acids Res.* 15(2):443–63
15. Goldknopf IL, French MF, Musso R, Busch H. 1977. Presence of protein a24 in rat liver nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74(12):5492–95
16. Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ. 2009. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(10):659–71
17. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243(4898):1576–83
18. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19(1):94–102
19. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. 2000. Activation of the ikappab kinase complex by traf6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103(2):351–61
20. Kulathu Y, Komander D. 2012. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond lys48 and lys63 linkages. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(8):508–23

21. McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A. 1991. Uba 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.* 10(1):227–36
22. Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA. 1982. Ubiquitin-activating enzyme. mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 257(5):2543–48
23. Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70:503–33
24. Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J. 1991. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64(3):483–84
25. Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP. 2000. Structure of a c-cbl-ubch7 complex: ring domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102(4):533–39
26. Scheffner M, Kumar S. 2014. Mammalian hect ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843(1):61–74
27. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. 1999. A novel ubiquitination factor, e4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96(5):635–44
28. Wilkinson KD. 1997. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 11(14):1245–56
29. Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, Sixma TK, Bernards R. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123(5):773–86
30. Larsen CN, Krantz BA, Wilkinson KD. 1998. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin c-terminal hydrolases. *Biochemistry (Mosc.).* 37(10):3358–68
31. Amerik AY, null, Swaminathan S, Krantz BA, Wilkinson KD, Hochstrasser M. 1997. In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.* 16(16):4826–38
32. Komander D, Clague MJ, Urbé S. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(8):550–63

33. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. 1997. Structure of 20s proteasome from yeast at 2.4 a resolution. *Nature* 386(6624):463–71
34. Bar-Nun S, Glickman MH. 2012. Proteasomal aaa-atpases: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823(1):67–82
35. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. 2002. A proteasomal atpase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416(6882):763–67
36. Rosenzweig R, Bronner V, Zhang D, Fushman D, Glickman MH. 2012. Rpn1 and rpn2 coordinate ubiquitin processing factors at proteasome. *J. Biol. Chem.* 287(18):14659–71
37. Rubin DM, van Nocker S, Glickman M, Coux O, Wefes I, Sadis S, Fu H, Goldberg A, Vierstra R, Finley D. 1997. Atpase and ubiquitin-binding proteins of the yeast proteasome. *Mol. Biol. Rep.* 24(1–2):17–26
38. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters KJ, Finley D, Dikic I. 2008. Proteasome subunit rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453(7194):481–88
39. Matiuhin Y, Kirkpatrick DS, Ziv I, Kim W, Dakshinamurthy A, Kleifeld O, Gygi SP, Reis N, Glickman MH. 2008. Extraproteasomal rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein dsk2 to proteasome. *Mol. Cell* 32(3):415–25
40. Piterman R, Braunstein I, Isakov E, Ziv T, Navon A, Cohen S, Stanhill A. 2014. Vwa domain of s5a restricts the ability to bind ubiquitin and ubl to the 26s proteasome. *Mol. Biol. Cell* 25(25):3988–98
41. Shi Y, Chen X, Elsasser S, Stocks BB, Tian G, Lee B-H, Shi Y, Zhang N, de Poot SAH, Tuebing F, Sun S, Vannoy J, Tarasov SG, Engen JR, Finley D, Walters KJ. 2016. Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science* 351(6275):

42. Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugasawa K, Maekawa T, Tanaka K, Hoeijmakers JH, Hanaoka F. 1999. Interaction of hhr23 with s5a. the ubiquitin-like domain of hhr23 mediates interaction with s5a subunit of 26 s proteasome. *J. Biol. Chem.* 274(39):28019–25
43. Saeki Y, Sone T, Toh-e A, Yokosawa H. 2002. Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26s proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296(4):813–19
44. Wilkinson CR, Seeger M, Hartmann-Petersen R, Stone M, Wallace M, Semple C, Gordon C. 2001. Proteins containing the uba domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat. Cell Biol.* 3(10):939–43
45. Bertolaet BL, Clarke DJ, Wolff M, Watson MH, Henze M, Divita G, Reed SI. 2001. Uba domains of dna damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat. Struct. Biol.* 8(5):417–22
46. Bertolaet BL, Clarke DJ, Wolff M, Watson MH, Henze M, Divita G, Reed SI. 2001. Uba domains mediate protein-protein interactions between two dna damage-inducible proteins. *J. Mol. Biol.* 313(5):955–63
47. Chen L, Madura K. 2002. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 22(13):4902–13
48. Lambertson D, Chen L, Madura K. 1999. Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors rad23 and rpn10 of *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 153(1):69–79
49. Funakoshi M, Sasaki T, Nishimoto T, Kobayashi H. 2002. Budding yeast dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(2):745–50
50. Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Maekawa T, Uchida A, van der Spek PJ, Eker AP, Rademakers S, Visser C, Aboussekhra A, Wood RD, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers

- JH. 1997. Two human homologs of rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of xpc repair activity. *Mol. Cell. Biol.* 17(12):6924–31
51. van der Spek PJ, Smit EM, Beverloo HB, Sugasawa K, Masutani C, Hanaoka F, Hoeijmakers JH, Hagemmeijer A. 1994. Chromosomal localization of three repair genes: the xeroderma pigmentosum group c gene and two human homologs of yeast rad23. *Genomics* 23(3):651–58
 52. van der Spek PJ, Eker A, Rademakers S, Visser C, Sugasawa K, Masutani C, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH. 1996. Xpc and human homologs of rad23: intracellular localization and relationship to other nucleotide excision repair complexes. *Nucleic Acids Res.* 24(13):2551–59
 53. Miller RD, Prakash L, Prakash S. 1982. Defective excision of pyrimidine dimers and interstrand dna crosslinks in rad7 and rad23 mutants of *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG.* 188(2):235–39
 54. Guzder SN, Habraken Y, Sung P, Prakash L, Prakash S. 1995. Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified rad proteins, replication protein a, and transcription factor tfiih. *J. Biol. Chem.* 270(22):12973–76
 55. Guzder SN, Sung P, Prakash L, Prakash S. 1998. Affinity of yeast nucleotide excision repair factor 2, consisting of the rad4 and rad23 proteins, for ultraviolet damaged dna. *J. Biol. Chem.* 273(47):31541–46
 56. Watkins JF, Sung P, Prakash L, Prakash S. 1993. The *saccharomyces cerevisiae* dna repair gene rad23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol. Cell. Biol.* 13(12):7757–65
 57. Schaubert C, Chen L, Tongaonkar P, Vega I, Lambertson D, Potts W, Madura K. 1998. Rad23 links dna repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 391(6668):715–18

58. Raasi S, Varadan R, Fushman D, Pickart CM. 2005. Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12(8):708–14
59. Masutani C, Araki M, Sugasawa K, van der Spek PJ, Yamada A, Uchida A, Maekawa T, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Hanaoka F. 1997. Identification and characterization of xpc-binding domain of hhr23b. *Mol. Cell. Biol.* 17(12):6915–23
60. Kim B, Ryu K-S, Kim H-J, Cho S-J, Choi B-S. 2005. Solution structure and backbone dynamics of the xpc-binding domain of the human dna repair protein hhr23b. *FEBS J.* 272(10):2467–76
61. Dantuma NP, Heinen C, Hoogstraten D. 2009. The ubiquitin receptor rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation. *DNA Repair* 8(4):449–60
62. Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA. 1999. The 19s regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol. Cell* 3(6):687–95
63. Vallen EA, Ho W, Winey M, Rose MD. 1994. Genetic interactions between cdc31 and kar1, two genes required for duplication of the microtubule organizing center in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137(2):407–22
64. Biggins S, Ivanovska I, Rose MD. 1996. Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. *J. Cell Biol.* 133(6):1331–46
65. Funakoshi M, Geley S, Hunt T, Nishimoto T, Kobayashi H. 1999. Identification of xdrp1; a xenopus protein related to yeast dsk2p binds to the n-terminus of cyclin a and inhibits its degradation. *EMBO J.* 18(18):5009–18
66. Kaye FJ, Modi S, Ivanovska I, Koonin EV, Thress K, Kubo A, Kornbluth S, Rose MD. 2000. A family of ubiquitin-like proteins binds the atpase domain of hsp70-like stch. *FEBS Lett.* 467(2–3):348–55

67. Kleijnen MF, Shih AH, Zhou P, Kumar S, Soccio RE, Kedersha NL, Gill G, Howley PM. 2000. The hplc proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol. Cell* 6(2):409–19
68. Medicherla B, Kostova Z, Schaefer A, Wolf DH. 2004. A genomic screen identifies dsk2p and rad23p as essential components of er-associated degradation. *EMBO Rep.* 5(7):692–97
69. Zhang D, Chen T, Ziv I, Rosenzweig R, Matiuhin Y, Bronner V, Glickman MH, Fushman D. 2009. Together, rpn10 and dsk2 can serve as a polyubiquitin chain-length sensor. *Mol. Cell* 36(6):1018–33
70. Isasa M, Katz EJ, Kim W, Yugo V, González S, Kirkpatrick DS, Thomson TM, Finley D, Gygi SP, Crosas B. 2010. Monoubiquitination of rpn10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol. Cell* 38(5):733–45
71. Zuin A, Bichmann A, Isasa M, Puig-Sàrries P, Díaz LM, Crosas B. 2015. Rpn10 monoubiquitination orchestrates the association of the ubiquitin-type dsk2 receptor with the proteasome. *Biochem. J.* 472(3):353–65
72. Liu Y, Xiao W. 1997. Bidirectional regulation of two dna-damage-inducible genes, mag1 and ddi1, from *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 23(4):777–89
73. Krylov DM, Koonin EV. 2001. A novel family of predicted retroviral-like aspartyl proteases with a possible key role in eukaryotic cell cycle control. *Curr. Biol. CB.* 11(15):R584-587
74. Nowicka U, Zhang D, Walker O, Krutauz D, Castañeda CA, Chaturvedi A, Chen TY, Reis N, Glickman MH, Fushman D. 2015. Dna-damage-inducible 1 protein (ddi1) contains an uncharacteristic ubiquitin-like domain that binds ubiquitin. *Struct. Lond. Engl.* 1993. 23(3):542–57
75. Wlodawer A, Gustchina A. 2000. Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477(1–2):16–34

76. Sirkis R, Gerst JE, Fass D. 2006. Ddi1, a eukaryotic protein with the retroviral protease fold. *J. Mol. Biol.* 364(3):376–87
77. Kožíšek M, Lepšík M, Grantz Šašková K, Brynda J, Konvalinka J, Rezáčová P. 2014. Thermodynamic and structural analysis of hiv protease resistance to darunavir - analysis of heavily mutated patient-derived hiv-1 proteases. *FEBS J.* 281(7):1834–47
78. Perteguer MJ, Gómez-Puertas P, Cañavate C, Dagger F, Gárate T, Valdivieso E. 2013. Ddi1-like protein from leishmania major is an active aspartyl proteinase. *Cell Stress Chaperones.* 18(2):171–81
79. Gabriely G, Kama R, Gelin-Licht R, Gerst JE. 2008. Different domains of the ubl-uba ubiquitin receptor, ddi1/vsm1, are involved in its multiple cellular roles. *Mol. Biol. Cell* 19(9):3625–37
80. Bernard D, Méhul B, Thomas-Collignon A, Delattre C, Donovan M, Schmidt R. 2005. Identification and characterization of a novel retroviral-like aspartic protease specifically expressed in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 125(2):278–87
81. Matsui T, Kinoshita-Ida Y, Hayashi-Kisumi F, Hata M, Matsubara K, Chiba M, Katahira-Tayama S, Morita K, Miyachi Y, Tsukita S. 2006. Mouse homologue of skin-specific retroviral-like aspartic protease involved in wrinkle formation. *J. Biol. Chem.* 281(37):27512–25
82. Kaplun L, Tzirkin R, Bakhrat A, Shabek N, Ivantsiv Y, Raveh D. 2005. The dna damage-inducible ubl-uba protein ddi1 participates in mec1-mediated degradation of ho endonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 25(13):5355–62
83. Clarke DJ, Mondesert G, Segal M, Bertolaet BL, Jensen S, Wolff M, Henze M, Reed SI. 2001. Dosage suppressors of pds1 implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control. *Mol. Cell. Biol.* 21(6):1997–2007

84. Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D. 1996. Anaphase initiation in *saccharomyces cerevisiae* is controlled by the apc-dependent degradation of the anaphase inhibitor pds1p. *Genes Dev.* 10(24):3081–93
85. Chen L, Shinde U, Ortolan TG, Madura K. 2001. Ubiquitin-associated (uba) domains in rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep.* 2(10):933–38
86. Ivantsiv Y, Kaplun L, Tzirkin-Goldin R, Shabek N, Raveh D. 2006. Unique role for the ubl-uba protein ddi1 in turnover of scfuol complexes. *Mol. Cell. Biol.* 26(5):1579–88
87. Cosma MP, Tanaka T, Nasmyth K. 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97(3):299–311
88. Kaplun L, Ivantsiv Y, Kornitzer D, Raveh D. 2000. Functions of the dna damage response pathway target ho endonuclease of yeast for degradation via the ubiquitin-26s proteasome system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(18):10077–82
89. Strathern JN, Klar AJ, Hicks JB, Abraham JA, Ivy JM, Nasmyth KA, McGill C. 1982. Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the mat locus. *Cell* 31(1):183–92
90. Lustgarten V, Gerst JE. 1999. Yeast vsm1 encodes a v-snare binding protein that may act as a negative regulator of constitutive exocytosis. *Mol. Cell. Biol.* 19(6):4480–94
91. Marash M, Gerst JE. 2003. Phosphorylation of the autoinhibitory domain of the sso t-snares promotes binding of the vsm1 snare regulator in yeast. *Mol. Biol. Cell* 14(8):3114–25
92. White RE, Dickinson JR, Semple CAM, Powell DJ, Berry C. 2011. The retroviral proteinase active site and the n-terminus of ddi1 are required for repression of protein secretion. *FEBS Lett.* 585(1):139–42

93. Dixit G, Baker R, Sacks CM, Torres MP, Dohlman HG. 2014. Guanine nucleotide-binding protein (α) endocytosis by a cascade of ubiquitin binding domain proteins is required for sustained morphogenesis and proper mating in yeast. *J. Biol. Chem.* 289(21):15052–63
94. Sivá M, Svoboda M, Veverka V, Trempe JF, Hofmann K, Kožíšek M, Hexnerová R, Sedlák F, Belza J, Brynda J, Šácha P, Hubálek M, Starková J, Flaisigová I, Konvalinka J, Grantz Šašková K. Human dna-damage-inducible 2 protein is structurally and functionally distinct from its yeast ortholog. *V Revizi*
95. Trempe JF, Grantz Šašková K, Sivá M, Ratcliffe CDH, Hoegl A, Ménade M, Feng X, Shenker S, Svoboda M, Kožíšek M, Veverka V, Konvalinka J, Gehring K. Structural studies of yeast dna damage-inducible protein (ddi1) reveal domain architecture of the ddi eukaryotic protein family. *V Revizi*
96. Nicolet CM, Craig EA. 1989. Isolation and characterization of sti1, a stress-inducible gene from *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9(9):3638–46
97. Chen S, Smith DF. 1998. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 273(52):35194–200
98. Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, Toft DO. 1998. Hop modulates hsp70/hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273(6):3679–86
99. QIAGEN. 2006. Qiaquick gel extraction kit protocols. In *QIAquick® Spin Handbook*. str. 25-27
100. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Sambrook, Joseph; University of Melbourne, Melbourne, Australia
101. ZYMO RESEARCH CORP. *INSTRUCTION MANUAL Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit*
102. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–54

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum	Poznámka